

Université de Montréal

**ÉTIOPATHOGENÈSE DE LA SCOLIOSE
IDIOPATHIQUE DE L'ADOLESCENT,
IMPLICATION DE LA MÉLATONINE ET DE
L'OSTÉOPONTINE**

par

Bouziane Azeddine

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Ph.D

en biologie moléculaire

Août 2009

© Bouziane Azeddine, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

ÉTIOPATHOGENÈSE DE LA SCOLIOSE IDIOPATHIQUE DE L'ADOLESCENT,
IMPLICATION DE LA MÉLATONINE ET DE L'OSTÉOPONTINE

Présentée par :
Bouziane Azeddine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Vacher, président-rapporteur
Dr Alain Moreau, directeur de recherche
Dr Hubert Labelle, co-directeur
Dr Mounib Elchebly, membre du jury
Dr René St-Arnaud, examinateur externe
Dre Muriel Aubry, représentante du doyen de la FES

Résumé

La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une maladie dont la cause est encore inconnue, et qui génère des déformations complexes du rachis, du thorax et du bassin. La prévalence est de 4% dans la population adolescente au Québec. Cette pathologie affecte surtout les filles durant leur poussée de croissance pubertaire. Parmi plusieurs hypothèses émises, l'hypothèse neuroendocrinienne, impliquant une déficience en mélatonine comme agent étiologique de la SIA a suscité beaucoup d'intérêt. Cette hypothèse découle du fait que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet produit une scoliose ressemblant sous plusieurs aspects à la pathologie humaine. La pertinence biologique de la mélatonine dans la scoliose est controversée, étant donné que la majorité des études chez l'homme n'ont pu mettre en évidence une diminution significative des niveaux de mélatonine circulante chez les patients scoliotiques. Nous avons démontré un dysfonctionnement dans la signalisation de la mélatonine au niveau des tissus musculo-squelettiques chez une série de patients atteints de SIA (Moreau & coll. 2004). Nous avons confirmé ce défaut chez un plus grand nombre de patients ainsi qu'en utilisant une nouvelle technologie (spectroscopie cellulaire diélectrique) n'ayant pas recours à un prétraitement des cellules donnant ainsi des résultats plus précis. Cette technique a montré la présence des mêmes groupes fonctionnels identifiés auparavant par la technique d'AMPc.

Le dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine est dû à une phosphorylation accrue des protéines G inhibitrices. Ce défaut pourrait être causé par un

déséquilibre de l'activité des kinases et phosphatases capables de réguler la phosphorylation des protéines Gi. Parmi ces kinases, PKC δ a suscité initialement notre intérêt vu qu'elle peut phosphoryler les protéines Gi. Nous avons démontré que cette kinase interagit avec le récepteur de la mélatonine MT2 et que cette interaction varie selon le groupe fonctionnel auquel un patient SIA appartient. Par la suite nos travaux se sont dirigés vers la découverte d'effecteurs cellulaires régulés par la mélatonine et plus spécifiquement l'ostéopontine (OPN), compte tenu de son rôle présumé comme mécanorécepteur et dans certaines structures jouant un rôle dans la proprioception, le contrôle postural et la fonction vestibulaire. L'OPN a été identifiée initialement par sa surexpression au niveau protéique et de l'ARNm dans la musculature paraspinale uniquement chez les poulets scoliotiques. Nous avons également utilisé un autre modèle animal, la souris C57Bl/6 naturellement déficiente en mélatonine. Nous avons généré des souris bipèdes en amputant les membres antérieurs de souris OPN KO, des souris CD44 KO ainsi que des souris contrôles C57Bl/6. Nos résultats ont montré qu'aucune souris OPN KO (n=50) ou CD44 KO (n=60) ne développe la maladie, contrairement aux souris contrôles C57Bl/6 (n=50) dont 45% deviennent scoliotiques. Ces résultats nous ont poussés à investiguer le rôle de cette protéine dans l'étiopathogenèse de la maladie chez l'humain. Nos résultats ont montré une augmentation des niveaux circulants d'OPN chez les patients atteints de la SIA et que l'élévation en OPN corrélait avec la sévérité de la maladie. Nos études chez les enfants asymptomatiques nés de parents scoliotiques et qui sont plus à risque de développer la maladie ont aussi démontré des différences

significatives au niveau des concentrations en OPN en comparaison avec les sujets sains. En effet, plusieurs enfants à risque présentaient des niveaux d'OPN supérieurs à 800ng/ml suggérant un plus grand risque de développer une scoliose indiquant aussi que l'augmentation des niveaux en OPN précède le début de la maladie.

Mots-clés : Scoliose, Mélatonine, Ostéopontine, PKC δ , test diagnostique.

Abstract

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is the most common form of scoliosis that affects a significant number of young teenagers, mainly females. Historically, several hypotheses were postulated to explain the aetiology of AIS. The neuroendocrine hypothesis involving a melatonin deficiency as the source for AIS has generated great interest. This hypothesis stems from the fact that experimental pinealectomy in chickens, and more recently in rats maintained in a bipedal mode, produces scoliosis. The biological relevance of melatonin in idiopathic scoliosis is controversial since no significant decrease in circulating melatonin level has been observed in a majority of studies. Analysis of melatonin signal transduction in musculoskeletal tissues of AIS patients demonstrated for the first time a defect occurring in a cell autonomous manner in different cell types isolated from AIS patients suffering of the most severe form of that disease. We confirmed this defect by analysing more AIS patients and by using a new technology (cellular dielectric spectroscopy) which gives more precise results because it allows the measurement and analysis of receptor activation without the need to pretreat cells. This technique showed the same functional classification into three functional groups as identified by cAMP technique.

Melatonin signalling dysfunction is caused by phosphorylation of serine residues affecting the activity of G inhibitory (Gi) proteins normally associated with melatonin receptors present at the cell surface. This defect could be caused by an imbalance in the

activity of kinases or phosphatases that can regulate Gi proteins phosphorylation. Among these kinases PKC δ was initially of interest because it has been shown that it can phosphorylate Gi proteins. We showed that this kinase interacts with melatonin receptor MT2 and that this interaction varies from one functional group to another. Thereafter, we moved one step further to characterise downstream effector regulated by melatonin. This work has led to the identification of osteopontin (OPN) which is a relevant candidate because it can act as a mecanosensor and it is involved in proprioception, postural and vestibular control. OPN was initially identified in pinealectomized chickens where it was shown to be upregulated at protein and mRNA levels only in scoliotic ones. We also used another animal model, C57Bl/6 mice which are naturally deficient in melatonin. We generated bipedal mice by amputating forelimbs of OPN knock-out mice, CD44 knock-out mice as well as C57Bl/6 wild type mice. Our results showed that all bipedal mice OPN Knock-out or CD44 Knock-out did not develop scoliosis contrasting with C57Bl/6 wt mice where 45% develop scoliosis. These results prompted us to investigate the role of this protein in scoliosis etiopathogenesis in humans. We showed an increase in the OPN circulating levels in AIS patients and this elevation correlates with disease severity. Elevated plasma OPN levels were also found in the asymptomatic at-risk group (offspring of scoliotic patients), suggesting that these changes precede scoliosis onset.

Keywords : Scoliosis, Melatonin, Osteopontin, PKC δ , Diagnostic test

Table des matières

Introduction	1
Objectifs de la thèse	2
Revue de la littérature	4
Première publication : Récents progrès dans l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent et nouveaux concepts moléculaires.....	5
Résumé.....	7
Introduction.....	8
Facteurs étiologiques de la scoliose idiopathique	8
Facteurs génétiques	9
Éléments structuraux du rachis	10
Facteurs neurologiques et musculaires.....	10
Facteurs biochimiques.....	11
Facteurs neuroendocriniens.....	12
Signalisation de la mélatonine et SIA	13
Développement d'un test fonctionnel pour le dépistage précoce de la SIA	15
Références.....	18
Nouvelle approche pour l'analyse de la voie de signalisation de la mélatonine.....	28
Régulation de la voie de signalisation de la mélatonine	32
Régulation de la signalisation de la mélatonine par phosphorylation.....	33
Régulation par des interactions protéine – protéine.....	35
Dimérisation des récepteurs à mélatonine et interaction avec d'autres récepteurs.....	35
Contribution des protéines d'échafaudage	37
Les protéines kinases C.....	38
Classification des PKCs	38
Structure des PKCs et leur régulation	39
Fonctions biologiques des PKCs.....	42
Cibles potentielles du défaut de signalisation de la mélatonine.....	44
Ostéopontine	46
Structure du gène	46
Régulation transcriptionnelle de l'OPN	47
Structure de la protéine	49
Modifications posttraductionnelles (MPTs).....	51
Phosphorylation	54
Glycosylation	56
Transglutamination	56
Récepteurs de l'OPN.....	57

Intégrines.....	57
CD44	58
Rôles physiologiques de l'OPN	59
Rôle de l'OPN dans l'os :	59
Système urinaire.....	61
Système immunitaire.....	61
Cancer	62
Autres rôles physiologiques de l'OPN.....	63
CD44	65
Structure du gène codant pour CD44.....	65
Structure de la protéine CD44.....	67
Domaine extracellulaire	67
Domaine transmembranaire	68
Domaine cytoplasmique.....	68
CD44 soluble.....	71
Fonctions biologiques de CD44	72
Résultats	75
Étude de la voie de signalisation de la mélatonine à l'aide de la spectrométrie cellulaire diélectrique.....	76
Introduction.....	76
Deuxième publication: Cell-based screening test for idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy.....	77
Structured Abstract	80
Introduction.....	83
Methods.....	85
Study populations.....	85
Peripheral blood mononuclear cells preparation.....	86
Cellular dielectric spectroscopy (CDS).....	86
CDS assay with human osteoblasts.....	86
CDS assay with PBMCs	87
cAMP assay in osteoblasts.....	87
Statistical analysis	88
Results	89
Study populations.....	89
Validation of CDS assay as prognostic test for IS	89
Diagnostic and prognostic performances of CDS assay for IS	91
Discussion	93
Acknowledgements.....	97
References	98

Figure legends	102
Régulation de la voie de signalisation de la mélatonine.	112
Introduction	112
Troisième publication: Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in AIS.	113
ABSTRACT	115
INTRODUCTION	116
MATERIALS AND METHODS	118
RESULTS	122
DISCUSSION	124
ACKNOWLEDGMENTS	128
Reference List	129
Rôle de l'ostéopontine dans la SIA.....	142
Introduction.....	142
Quatrième publication: High Circulating Levels of Osteopontin Are Associated with Idiopathic Scoliosis Onset and Spinal Deformity Progression	143
ABSTRACT	145
Introduction.....	147
METHODS	149
Study populations.....	149
Osteopontin and sCD44 enzyme-linked immunosorbent assays	149
Generation of bipedal C57Bl/6 OPN-null and CD44-null mice	150
Statistical analysis	151
RESULTS	152
Study populations.....	152
Plasma OPN and sCD44 levels are associated with Idiopathic Scoliosis.....	153
OPN signaling in Idiopathic Scoliosis	154
DISCUSSION	155
Diagnostic value of plasma Osteopontin and sCD44 in Idiopathic Scoliosis.....	155
Contribution of sCD44 as a potential disease-modifying factor?	156
Does idiopathic Scoliosis onset is induced by OPN-CD44 signal transduction?	156
Legends for Figures	159
Reference List	164
DISCUSSION GÉNÉRALE	168
Confirmation du défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA	169
Classification moléculaire des patients SIA.....	172
Mise en évidence du rôle de l'OPN dans le développement de la SIA.....	177
Rôles de l'OPN dans la SIA chez l'humain.....	182
Par quel mécanisme l'OPN induit elle la déformation rachidienne?	185

Causes possibles de l'augmentation des niveaux de l'OPN.....	186
Développement d'un test diagnostique pour la SIA	189
Perspectives.....	191

Liste des tableaux

Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA.....	24
Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA (suite)	25
Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA (suite)	25
Tableau 2 : Principales fonctions biologiques des PKCs.....	43
Tableau 3 : Liste des autres rôles potentiels de l'OPN	64
Tableau 4 : Fonctions de CD44.....	74
TABLE 1. Clinical Variables Associated with AIS Patients Tested (Continued)	136
Table 2. Clinical variables associated with control subjects.....	137
Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with IS, healthy control and at risk control subjects.....	160
Table 2. Association between the plasma levels of OPN and sCD44 and IS.	161
Table 3. Frequency of scoliosis in bipedal C57Bl/6 mice and genetically modified mice devoid of OPN or CD44.....	162

Liste des figures

Figure 1. A. Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPC dans les ostéoblastes humains. B : défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA.	26
Figure 2. Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients scoliotiques.	27
Figure 3. Appareil CellKey TM	31
Figure 4. Structure des différentes isoformes des PKCs. Adaptée de Kheifets & Mochly-Rosen 2007.	41
Figure 5. Alignement des séquences protéiques d'OPN de différentes espèces.	52
Figure 6. Représentation schématique des différents domaines protéiques de l'OPN	53
Figure 7. Représentation schématique de la structure du gène de CD44 et de certaines isoformes produites par épissage alternatif.	66
Figure 8. Structure protéique du CD44s comparée à l'isoforme la plus longue (CD44v1-v10).	70
Figure 1. Contribution of Gi proteins in melatonin signaling is detected by CDS.	102
Figure 2. Melatonin signaling dysfunction is demonstrated using two different methods. In panel A, o	102
Figure 3. Precision and dynamic range of the functional assay using the CellKey TM system.	102
Figure 1. Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.	133
Figure 2. Interaction of MT2 melatonin receptor with PKC δ	133
Figure 3. Analysis of RACK1 interactions with PKC δ	133
Figure 1. Relationship between plasma osteopontin levels and Cobb's angle in patients affected with IS	159
Figure 8. Effet du traitement des poulets avec un inhibiteur transcriptionnel de l'OPN sur le taux d'induction de scoliose.	180

Abréviations

AKAP	Protéine d'ancrage de la PKA
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Enzyme hydrolysant l'ATP
BMP	Bone morphogenetic protein
BSP1	Bone sialoprotein
CDS	Spectroscopie cellulaire diélectrique
DMP1	Dentin matrix protein 1
DSPP	Dentin sialophosphoprotein
G	Protéine à activité GTPase
GAG	Glycosaminoglycanes
GDP	Guanosine diphosphate
Gi	G inhibitrice
Gln	Glutamine
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
GRK	Kinase des GPCR
Gs	G stimulatrice
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Acide hyaluronique
Hz	Hertz
KO	Knock-out
MEPE	Matrix extracellular phosphoprotein
MPT	Modifications posttraductionnelles
MT1	récepteur de la mélatonine 1
MT2	Récepteur de la mélatonine 2

OPN	Ostéopontine
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca ²⁺
PTPR	Récepteur tyrosine phosphatase
RACK1	Récepteur activé par la PKC 1
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
RGD	Motif de liaison aux intégrines. Arginine Glycine Aspartate
sCD44	CD44 soluble
Ser	Sérine
SIA	Scoliose idiopathique de l'adolescent
SNC	Système nerveux central
SPP1	secreted phosphoprotein 1
TGFβ	Transforming growth factor
Thr	Thréonine

Je dédie cette thèse à ma famille :

À feu mon père

À ma mère

À ma femme et mon fils

À mes frères et sœurs

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Jean Vacher, Dr René St-Arnaud et Dr Mounib Elchebly d'avoir accepté d'évaluer cette thèse qui je l'espère saura faire l'objet de riches discussions. Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mon directeur le Dr Alain Moreau, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir accordé la chance de participer à des recherches de haut niveau ayant permis une grande avancée dans la détermination de l'étiologie de la scoliose. Je le remercie pour sa clairvoyance, son professionnalisme et plus particulièrement, pour le dynamisme qu'il a essayé de me transmettre tout au long de mes travaux. Ses conseils et sa grande disponibilité étaient d'une grande aide pour la réalisation de ce travail. Sans oublier sa confiance et l'autonomie qu'il m'a laissée pour réaliser mon projet. Je tiens également à remercier l'ensemble des membres passés et présents du laboratoire. Je les remercie pour les discussions enrichissantes qu'on a eues ensemble ainsi que pour la bonne ambiance qui règne dans le laboratoire.

Je remercie mon codirecteur, Dr Hubert Labelle pour son encadrement et pour l'apport de son expertise clinique dans l'élaboration des publications réalisées dans le cadre de cette thèse. Je remercie également les autres chirurgiens orthopédistes pour leur précieuse collaboration dans la réalisation de ce projet de recherche. Un grand merci aux patients qui ont participé à cette étude. Sans vous, ce travail n'aurait pas vu le jour en

espérant voir un jour les fruits de ce travail se traduire en traitements capables de soulager vos maux et surtout de les prévenir

Je remercie chaleureusement Dr Florina Moldovan pour ses conseils et sa précieuse collaboration ainsi que toute l'équipe de son laboratoire.

Je remercie ma femme d'avoir supporté mon indisponibilité tout au long de mes études doctorales. Je te remercie pour ton amour et ton soutien inconditionnel. Je remercie aussi mon fils pour avoir changé ma vie et pour tout le bonheur que son sourire me procure.

Un remerciement particulier à Mme Nathalie Jourdain pour sa gentillesse, son enthousiasme et sa bonne humeur, de même pour Mme Vivianne Jodoin. Je remercie Denise Carrier et toute l'équipe de l'animalerie du CHU Sainte-Justine. Je vous remercie pour vos innombrables conseils et de m'avoir aidé dans toutes l'expérimentation animale.

Je remercie tous mes amis et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Finalement, je remercie grandement le programme MENTOR des IRSC, la fondation de l'Hôpital Sainte Justine, le programme de biologie moléculaire pour leur soutien financier. Je me dois aussi de remercier les organismes subventionnaires de ce projet soit la fondation Yves Cotrel de l'institut de France et la compagnie Paradigm Spine.

Introduction

La scoliose a été officiellement décrite pour la première fois par Hippocrate sous le nom de «Spina-Luxa» (Mauroy 1996). Le mot scoliose vient du grec skolios = tortueux, ce terme a été utilisé pour la première fois par Gallen (201-130 av J-C) (Machida 1999). Les anciens auteurs avaient bien conscience de ce caractère tortueux acquis par le rachis atteint de scoliose. L'avènement de la radiographie a poussé les médecins et chirurgiens à se concentrer sur le caractère bidimensionnel de la courbure de la colonne vertébrale chez les scoliotiques, puisque la radiographie n'offre qu'une projection uniplanaire de la déformation. Le développement de nouvelles techniques, notamment l'imagerie en 3-D a permis de redécouvrir le caractère tridimensionnel et la torsion du rachis. De nos jours, la déformation de la colonne vertébrale ne se lit plus dans un plan frontal uniquement, mais est reconnue aussi dans le plan sagittal et dans le plan transverse.

Malgré que la scoliose ait été décrite, tel que cité plus haut, il y a plus de 2400 ans, son étiologie demeure encore obscure. Plusieurs équipes de recherche ont tenté d'en découvrir la cause et ont émis plusieurs hypothèses afin d'expliquer l'étiologie de la maladie (discuté dans le chapitre suivant). En effet, une simple recherche sur Pubmed (NCBI) en utilisant «scoliosis» comme mot clé nous donne plus de 13200 articles (de 1950 à 2008).

L'idée directrice de cette thèse est d'étudier l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Plus spécifiquement l'implication de la mélatonine et de l'ostéopontine dans le processus de développement et de progression de la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA).

Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse consistait à étudier l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressé à caractériser le défaut de signalisation de la mélatonine chez les trois groupes identifiés par l'analyse de cette signalisation, à étudier les différences moléculaires entre ces différents groupes et finalement identifier et caractériser les effecteurs en aval de cette signalisation déficiente.

1- Confirmation du défaut de la voie de signalisation. Nous avons identifié précédemment un défaut de signalisation de la mélatonine chez tous les patients SIA analysés (Moreau & coll. 2004). Notre but était de confirmer ce défaut en analysant cette voie chez un plus grand nombre de patients scoliotiques et de sujets témoins. La technique utilisée consiste à mesurer les variations des niveaux intracellulaires d'AMPc. Vu que l'AMPc est un second messenger très volatile et régulé par une multitude de voies de signalisation, nous avons décidé d'analyser la signalisation de la mélatonine en utilisant une nouvelle technique, la spectroscopie cellulaire diélectrique, ayant fait ses preuves comme outil important pour l'analyse des voies de signalisation impliquant des récepteurs couplés aux protéines G. Cette technique est plus précise et plus reproductible.

2- Classification moléculaire des patients SIA. L'analyse des causes du défaut de signalisation de la mélatonine a permis de déterminer que les protéines Gi couplées aux récepteurs à mélatonine sont hyperphosphorylées chez les patients SIA (Moreau & coll. 2004). Nous nous sommes intéressés à étudier au niveau moléculaire les différences existantes entre les trois groupes de patients SIA, plus spécifiquement à analyser les

interactions du récepteur MT2 avec les différentes protéines impliquées dans la régulation de la phosphorylation des protéines Gi.

3- Détermination des cibles en aval de la signalisation de la mélatonine. Nos résultats ont montré un défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA alors que dans les modèles animaux c'est une carence en mélatonine qui induit la scoliose. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'absence de la mélatonine ou bien le défaut de sa signalisation induisent la scoliose via un facteur commun. Le but de ce projet était d'identifier et de caractériser ce facteur et valider son rôle dans les différents modèles animaux et chez l'humain.

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que nous avons atteints les objectifs fixés au début et que nous avons pu confirmer les hypothèses émises. De plus, ces résultats constituent une avancée scientifique majeure au niveau de la compréhension de l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Nous avons pu mettre au point un test diagnostique pouvant déceler les enfants à risque de développer la maladie et les patients scoliotiques qui risquent de progresser ce qui montre le grand impact clinique de cette étude.

Revue de la littérature

**Première publication : Récents progrès dans
l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique de
l'adolescent et nouveaux concepts moléculaires.**

Article publié dans la revue Médecine-Science 2007 Nov;23(11):910-6.

Ma participation dans cet article :

J'ai participé à la rédaction du premier manuscrit de cet article, à la conception des figures
et à la révision finale du manuscrit.

Récents progrès dans l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent et nouveaux concepts moléculaires

Kareen Letellier^{1,4,§}, Bouziane Azeddine^{1,§}, Sacha Blain¹, Isabelle Turgeon¹, Da Shen Wang¹, Mamadou Samba Boiro¹, Florina Moldovan^{2,5}, Hubert Labelle^{5,6}, Benoît Poitras^{5,6}, Charles-Hilaire Rivard^{5,6}, Guy Grimard^{5,6}, Stefan Parent⁶, Jean Ouellet^{6,7}, Ginette Lacroix¹, Alain Moreau^{1,2,3,*}

¹Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, Laboratoire de génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques; ²Département de stomatologie, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal; ³Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal; ⁴Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, Laboratoire de biologie cellulaire et tissulaire des maladies musculo-squelettiques; ⁵Service d'orthopédie, CHU Sainte-Justine, Montréal; ⁶Service d'orthopédie, Hôpital Shriners pour enfants de Montréal; ⁷Service d'orthopédie Hôpital pour enfants de Montréal, Université McGill.

§ : Sont considérés comme co-premiers auteurs.

Correspondance :

Dr Alain MOREAU

Centre de recherche CHU Sainte-Justine, Laboratoire de génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques, 3175, chemin de la Côte-Ste-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5 Canada.

Résumé

La scoliose est la déformation la plus fréquente en orthopédie pédiatrique. Elle survient principalement à l'adolescence affectant les filles en plus grand nombre et avec le plus de sévérité. Nos travaux ont mis en évidence un défaut dans la transmission du signal de l'hormone mélatonine chez des patients gravement atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent. Cette anomalie est causée par la phosphorylation de résidus sérine au niveau des protéines G inhibitrices couplées aux récepteurs à mélatonine. Nous avons observé chez les patients SIA trois types de réponses anormales en présence de mélatonine ce qui suggère que ce défaut est attribuable à des gènes distincts en cause dans cette voie de signalisation. Cette découverte nous a permis de mettre au point un premier test de dépistage précoce à partir d'une simple prise de sang. Actuellement en cours de validation clinique au Canada, ce test devrait permettre l'identification des enfants porteurs du risque de développer une SIA.

Introduction

La scoliose est la déformation la plus fréquente en orthopédie pédiatrique : elle se manifeste par une déformation structurale évolutive de la colonne vertébrale, de la cage thoracique et du bassin dans les trois plans de l'espace et dans le temps. Une large proportion soit 85% des scolioses sont dites idiopathiques, cela signifie qu'on en ignore la cause ; les 15% restants sont causées par des malformations congénitales, des maladies neuromusculaires ou associées à des pathologies osseuses ou à des pathologies des tissus conjonctifs. L'étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA), la forme la plus commune de scoliose, n'est pas claire bien que la SIA soit une maladie affectant un nombre important de jeunes adolescents (0,2-6% de la population), touchant principalement les filles en nombre et avec le plus de sévérité. Outre la déformation du rachis, cette maladie peut avoir des conséquences importantes sur la santé des patients et affecter des fonctions d'équilibre, vestibulaire et proprioceptive, altérer le tonus musculaire et susciter l'apparition prématurée d'ostéoporose chez certaines patientes à l'âge adulte. De nos jours, on admet volontier que la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une maladie d'origine multifactorielle. En effet, des facteurs d'ordre génétique, neurologique, endocrinien, biomécanique, métabolique et autres peuvent intervenir tant dans le déclenchement que dans l'aggravation de cette maladie.

Facteurs étiologiques de la scoliose idiopathique

Plusieurs perspectives divergentes ont été présentées dans l'espoir de définir plus clairement l'étiologie de la SIA et d'expliquer les différentes perturbations associées à la déformation du rachis observée chez les patients SIA [1;2]. Dans cette synthèse nous

proposons un survol des différents facteurs considérés dans l'étiologie de la SIA et nous nous attarderons aux plus récents concepts moléculaires impliquant un défaut de signalisation de la mélatonine dans l'étiopathogenèse de la SIA.

Facteurs génétiques

Des observations de vrais jumeaux atteints de scolioses ont été rapportées à de nombreuses reprises et montrent le développement de scoliose dans 73% des cas pour les jumeaux identiques et 36% des cas chez les jumeaux gémellaires [3;4] confirmant la contribution de facteurs génétiques. Bien que la composante héréditaire puisse être présente dans certaines familles, on note que 85% des scolioses idiopathiques constituent des cas sporadiques : elles surviennent dans des familles n'ayant aucun antécédent. Néanmoins, plusieurs études ont clairement mis en évidence que la SIA survient avec une fréquence plus élevée dans certaines familles [1]. Les travaux de Wynne-Davies [5] et de DeGeorge [6] ont permis de démontrer une incidence familiale suggérant un mode de transmission dominante et ont d'ailleurs établi une prévalence dans la transmission de la scoliose variant de 17 à 42% chez les filles et de 7 à 29% chez les garçons issus d'un parent atteint de SIA sans qu'il y ait une différence significative selon que la mère ou le père soit affecté d'une scoliose [5;6]. La prédominance de la SIA chez les filles a conduit plusieurs groupes à examiner une possible transmission de la SIA via le chromosome X [7]; d'autres groupes favorisent plutôt une transmission autosomale [8]. Les plus récentes données génétiques obtenues dans différentes populations ont mis en évidence un nombre croissant de loci de susceptibilité pour la SIA, contribuant ainsi à accroître la difficulté d'identifier un ou plusieurs gènes candidats responsables de cette maladie (*Tableau 1*). Certes ce décompte peut s'expliquer par le nombre limité de familles comprenant plusieurs cas de

SIA recrutées à ce jour mais aussi on peut l'attribuer à l'absence de méthodes permettant de mieux classer les patients scoliotiques. En effet, les analyses génétiques reposent sur le phénotype principal soit la courbure du rachis. Cependant, d'autres paramètres cliniques, biochimiques ou métaboliques devraient être pris en compte afin de tirer profit des plus récentes études génétiques et de mieux définir l'étiopathogénèse de la SIA.

Éléments structuraux du rachis

La scoliose est un des signes cliniques qu'on retrouve dans plusieurs maladies affectant le tissu conjonctif (syndrome de Marfan, hyperlaxité articulaires d'Ehlers-Danlos, l'homocystinurie et l'ostéogénèse imparfaite) [9]. Des altérations du collagène seraient aussi reliées à des facteurs environnementaux notamment une insuffisance en cuivre déclenchant une scoliose, car le cuivre intervient dans la régulation de la lysiloxydase, chaînon important du métabolisme du collagène [10]. Dans ce contexte, il n'est donc pas surprenant que les principaux éléments des structures vertébrales, soit le collagène et les protéoglycanes, aient été analysés dans l'espoir d'élucider la cause de la SIA [11;12]. Ces différents changements de points de vue sont résumés au *Tableau 1*. En définitive, l'analyse des gènes codant pour ces différentes composantes a permis d'exclure la moindre implication de ces gènes dans l'étiopathogénèse de la scoliose [13;14]. Conséquemment, les modifications observées dans la SIA seraient plutôt des événements secondaires associés à cette maladie et ils se limiteraient seulement à l'aggravation des déformations.

Facteurs neurologiques et musculaires

Plusieurs preuves expérimentales relèvent des anomalies de fonctionnement des centres du contrôle postural situés dans le cerveau, qui priveraient la colonne vertébrale

d'informations nécessaires à sa croissance régulière en hauteur [15]. La mauvaise intégration de ces informations dans le système nerveux central (SNC) ou encore dans le système nerveux périphérique pourrait expliquer la croissance asymétrique du rachis chez les enfants et adolescents atteints de SIA. En effet, la destruction de l'hypothalamus chez le rat par stéréotaxie électrique entraîne la formation d'une scoliose [16]. Une étude réalisée sur 150 sujets scoliotiques a montré que 79% d'entre eux présentaient des anomalies de fonctionnement de l'équilibre orthostatique portant autant sur la proprioception que sur les réflexes oculomoteurs; en comparaison, seulement 5% des sujets témoins présentaient ces anomalies [17]. Le rôle de la musculature spinale dans la pathogenèse de la scoliose idiopathique a été également le sujet de nombreuses études, en particulier dans la distribution des différents types de fibres associés à la déformation [18]. Mannion et coll. ont montré chez 14 adolescentes scoliotiques qu'il y avait une proportion significativement plus faible de fibres de type I dans les muscles du côté concave de la courbe scoliotique mais pas de différence du côté convexe [19].

Facteurs biochimiques

Les facteurs biochimiques en jeu dans l'étiopathogenèse de la scoliose ont surtout été observés dans les plaquettes sanguines qui sont également des cellules présentant une activité contractile [20-22]. Une augmentation du calcium et du phosphore intracellulaire dans les plaquettes de patients SIA, ainsi qu'une diminution de l'activité de plusieurs protéines intracellulaires telles que les protéines contractiles et la myosine adénosine triphosphatase ont été observées [20]. L'augmentation des taux de calmoduline dans les plaquettes de patients SIA serait associée à la SIA et notamment à la progression de la courbure de la scoliose [21]. Plus récemment, les travaux provenant des équipes dirigées

par les Drs Enouf à Paris et Moreau à Montréal ont mis en évidence un défaut dans la différenciation et dans la maturation des plaquettes sanguines des sujets atteints de SIA particulièrement en étudiant les profils d'expression de différents isoformes des ATPases calciques PMCA et SERCA. Cependant, les défauts observés dans les plaquettes représenteraient une indication des changements métaboliques survenant dans d'autres types cellulaires et dans les tissus tels que les muscles et les ostéoblastes plutôt qu'un événement primaire à l'origine de la SIA [20-22].

Facteurs neuroendocriniens

La piste neuroendocrinienne fondée sur l'hypothèse qu'une carence en mélatonine serait à la source de la SIA a suscité beaucoup d'intérêt et de controverses. Cette hypothèse découle du fait que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet ou le rat maintenu dans un mode bipède, produit une scoliose similaire en plusieurs points à la maladie humaine [15]. Plus récemment, des résultats identiques ont été obtenus chez des souris bipèdes et quadrupèdes de souche C57B1/6 (souris dont la voie de synthèse de la mélatonine est diminuée à la suite d'une mutation) [23]. En effet, la mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est une neurohormone principalement synthétisée par la glande pinéale selon un rythme circadien; elle est sécrétée dans la circulation où elle agit sur des tissus cibles [24]. La mélatonine est synthétisée également par d'autres cellules notamment les lymphocytes et les plaquettes et régule plusieurs activités physiologiques notamment l'horloge biologique (cycle circadien), le système nerveux et immunitaire de même que le métabolisme osseux. L'injection de doses quotidiennes de mélatonine exogène chez les animaux pinéalectomisés prévient la formation d'une scoliose [23]. La pertinence biologique de la mélatonine dans la SIA est cependant controversée puisque la plupart des

études n'ont pu mettre en évidence une diminution significative du taux de mélatonine circulante chez les patients SIA. En outre, ni l'ablation de la glande pinéale chez les animaux supérieurs comme le singe, ni la destruction de la glande pinéale par des traitements de radiothérapie chez les enfants atteints d'un cancer rare de la glande pinéale ne conduit au développement d'une scoliose : ces faits vont à l'encontre de l'hypothèse d'une carence en mélatonine comme facteur étiologique de la SIA. Voilà pourquoi nous avons été conduits à vérifier si la SIA pouvait compter parmi ses facteurs de déclenchement un défaut de signalisation de la mélatonine dans la cellule.

Signalisation de la mélatonine et SIA

La mélatonine exerce ses effets par le biais de récepteurs spécifiques de haute affinité. Ces récepteurs de la mélatonine sont couplés à des petites protéines appelées protéines G inhibitrices ou Gi (*guanine nucleotide-binding protein*) et leur activation conduit à une inhibition des adénylates cyclases, enzymes responsables de la synthèse d'AMPc. Par clonage moléculaire, trois sous-types de récepteurs mélatoninergiques couplés aux protéines G ont été identifiés chez les vertébrés [25]. Les propriétés de liaison au ligand, ainsi que les mécanismes de signalisation de ces récepteurs sont remarquablement similaires. Chaque sous-type de récepteur est couplé à une inhibition de l'accumulation d'AMPc. Les gènes des récepteurs MT1 et MT2 sont présents chez les mammifères et de nombreuses données démontrent que MT1 est le récepteur qui régule les fonctions reproductives et circadiennes en réponse à la mélatonine [25]. Le troisième récepteur, MelR1c (deux isoformes α et β) a uniquement été détecté chez le poulet et le Xénope. Un deuxième type de récepteur de la mélatonine, appelé MT3, a d'abord été découvert grâce à ses propriétés pharmacologiques mais il est fort distinct des récepteurs

MT1 et MT2 [26]. Récemment, les récepteurs MT3 de l'homme et de la souris ont été clonés; ils correspondent à une protéine codée par un gène homologue de la quinone réductase 2 (QR2). Le rôle exact de ce gène dans la transmission du signal de la mélatonine reste à déterminer. En dehors des récepteurs membranaires, les récepteurs nucléaires orphelins RZR α et β ont été proposés comme interagissant avec la mélatonine [27]. Nous avons été les premiers à démontrer un dysfonctionnement de la signalisation intracellulaire de la mélatonine dans les tissus musculo-squelettiques d'une cohorte de patients atteints de SIA [28] que nous avons comparée à une série de sujets témoins atteints ou non d'un autre type de scoliose cliniquement reconnu et décrit. Les tests que nous avons effectués ont permis d'observer trois types de réponses en présence de concentrations croissantes de mélatonine suggérant ainsi la participation possible de gènes distincts dans ce défaut de signalisation chez certains patients SIA (*Figure 1A*). De plus, la faible capacité à inhiber l'activité des adénylates cyclases stimulées par la forskoline a également été observée avec un analogue non hydrolysable du GTP, le Gpp(NH)p, permettant de penser qu'un tel dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la SIA pourrait être induit par une hypo-fonctionnalité sélective des protéines Gi, fait d'ailleurs accrédité par une augmentation de la phosphorylation des protéines Gi couplées aux récepteurs de la mélatonine. En effet, les modifications post-traductionnelles des protéines Gi impliquant la phosphorylation de résidus sérine à leur extrémité N-terminale sont bien connues pour bloquer la formation d'hétérotrimères fonctionnels avec les sous-unités G β et G γ , empêchant ainsi l'inhibition de l'activité des adénylates cyclases en présence d'un ligand spécifique [29]. Cette phosphorylation anormale nichée dans les ostéoblastes et dans plusieurs autres types cellulaires testés témoignant d'un défaut systémique (*Figure 1B*). Fait intéressant, les oestrogènes inhibent fortement l'expression et la synthèse de la sous-

unité α des protéines G (G_{i1-3} et G_s) dans des cultures d'ostéoblastes [30], suggérant ainsi que la signalisation de la mélatonine pourrait être modulée par les oestrogènes. On peut remarquer que la capacité des oestrogènes à moduler les niveaux des protéines G (G_s et G_i) pourrait expliquer la prévalence des manifestations cliniques de la SIA à l'adolescence et le fait que les filles soient plus sévèrement atteintes que les garçons. Dans ce sens, la mise en évidence d'un défaut de signalisation de la mélatonine vient non seulement actualiser le rôle de cette hormone dans la pathogénie de la scoliose mais, de plus, constitue un concept unificateur pouvant expliquer la majorité des affections associées à la scoliose (*Figure 2*). De plus, ce nouveau concept moléculaire a permis de développer un premier test de dépistage fonctionnel de la SIA actuellement en cours de validation clinique.

Développement d'un test fonctionnel pour le dépistage précoce de la SIA

Comme il n'existe pour le moment aucun test ni une quelconque façon de prévoir l'apparition d'une scoliose; celle-ci n'est diagnostiquée que lorsque la déviation de la colonne commence à être apparente. Ainsi c'est toute la manière dont on traite les patients scoliotiques depuis des décennies qui sera bouleversée, voire transformée, par la mise au point d'un test de dépistage précoce. Le test cible deux populations distinctes. Premièrement, les enfants dits à risque c'est-à-dire ceux provenant de familles présentant plusieurs cas de scoliose ou encore ceux dont l'un des deux parents est scoliotique [5; 6]. Deuxièmement les enfants et les adolescents en début de maladie (c'est-à-dire, victimes d'une déformation du rachis apparente comprise entre 10° et 30°) au sein desquels il sera possible d'identifier ceux qui présentent un risque de progression rapide. Le test est relativement simple puisque à partir d'un échantillon sanguin, les lymphocytes, possédant

des récepteurs de la mélatonine, sont isolés et utilisés pour déterminer la présence d'un défaut dans la transmission de la mélatonine. Ce défaut est déterminé par un test biochimique mesurant la capacité de la mélatonine à inhiber la synthèse d'AMPc, molécule chimique produite par la cellule et agissant comme messenger intracellulaire secondaire (*Figure 1*). La production d'AMPc est artificiellement stimulée par un traitement en présence de forskoline, molécule qui stimule l'activité des adénylates cyclases, enzymes membranaires chargés de la synthèse d'AMPc. En présence de concentrations croissantes de mélatonine, on observe une réduction rapide de cette synthèse dans les lymphocytes des sujets sains; en revanche, dans les lymphocytes des patients SIA, on observe une absence d'inhibition. Nous avons identifié trois types de réponses anormales chez les sujets SIA ce qui nous permet de faire une classification fonctionnelle des patients. En outre, ce test fonctionnel permet le dépistage précoce de la SIA sans avoir a priori une connaissance des mutations ou des gènes en cause dans la SIA puisqu'il cible une voie de signalisation ce qui couvre un ensemble plus général.

Remerciements

Nous tenons à remercier sincèrement les patients et leur famille qui ont participé à cette étude, de même que les cliniciens qui nous ont référé ces patients. Ce projet de recherche est subventionné par la Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France (Drs Moreau et Labelle) et la validation des tests cliniques par la société Paradigm Spine de New York (Dr Moreau).

Summary

Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis and new molecular concepts

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is the most common form of scoliosis that affects a significant number of young teenagers, mainly females (0.2-6% of the population). Historically, several hypotheses were postulated to explain the aetiology of AIS, including genetic factors, biochemical factors, mechanics, neurological, muscular factors and hormonal factors. The neuroendocrine hypothesis involving a melatonin deficiency as the source for AIS has generated great interest. This hypothesis stems from the fact that experimental pinealectomy in chicken, and more recently in rats maintained in a bipedal mode, produces a scoliosis. The biological relevance of melatonin in idiopathic scoliosis is controversial since no significant decrease in circulating melatonin level has been observed in a majority of studies. Analysis of melatonin signal transduction in musculoskeletal tissues of AIS patients demonstrated for the first time a defect occurring in a cell autonomous manner in different cell types isolated from AIS patients suffering of the most severe form of that disease. These results have led to a classification of AIS patients in three different functional groups depending on their response to melatonin, suggesting that the cause of AIS involves several genes. Molecular analysis showed that melatonin signaling dysfunction is triggered by an increased phosphorylation of Gi proteins inactivating their function. This discovery has led to development of a first scoliosis screening assay. This test, using blood sample, is currently in clinical validation process in Canada and could be used for screening children at high risk of developing AIS-

Références

- [1] Cowell HR, Hall JN, MacEwen GD. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. A Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin Orthop Relat Res* 1972; 86: 121-31.
- [2] Lowe TG, Edgar M, Margulies JY, *et al.* Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A: 1157-68.
- [3] Carr AJ. Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 1077.
- [4] Burwell RG. Aetiology of idiopathic scoliosis: current concepts. *Pediatr Rehabil* 2003; 6: 137-70.
- [5] Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone Joint Surg Br* 1968; 50: 24-30.
- [6] De George FV, Fisher RL. Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects. *J Med Genet* 1967; 4: 251-7.
- [7] Justice CM, Miller NH, Marosy B, *et al.* Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003; 28: 589-94.
- [8] Salehi LB, Mangino M, De SS, *et al.* Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* 2002; 111: 401-4.
- [9] Pyeritz RE, McKusick VA. The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med* 1979; 300: 772-7.
- [10] Dastyh M, Cienciala J. Idiopathic scoliosis and concentrations of zinc, copper, and selenium in blood plasma. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89: 105-10.
- [11] Hadley-Miller N, Mims B, Milewicz DM. The potential role of the elastic fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1193-206.

- [12] Akhtar S, Davies JR, Caterson B. Ultrastructural localization and distribution of proteoglycan in normal and scoliotic lumbar disc. *Spine* 2005; 30: 1303-9.
- [13] Miller NH, Mims B, Child A, *et al.* Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis. *J Orthop Res* 1996; 14: 994-9.
- [14] Carr AJ, Ogilvie DJ, Wordsworth BP, *et al.* Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop* 1992; 305-10.
- [15] Dubousset J, Machida M. [Possible role of the pineal gland in the pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental and clinical studies]. *Bull Acad Natl Med* 2001; 185: 593-602.
- [16] Yamada K, Ikata T, Yamamoto H, *et al.* Equilibrium function in scoliosis and active corrective plaster jacket for the treatment. *Tokushima J Exp Med* 1969; 16: 1-7.
- [17] Yamada K, Yamamoto H, Nakagawa Y, *et al.* Etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 1984; 50-7.
- [18] Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth? *Eur Spine J* 2001; 10: 473-81.
- [19] Mannion AF, Meier M, Grob D, *et al.* Paraspinal muscle fibre type alterations associated with scoliosis: an old problem revisited with new evidence. *Eur Spine J* 1998; 7: 289-93.
- [20] Yarom R, Meyer S, More R, *et al.* Metal impregnation abnormalities in platelets of patients with idiopathic scoliosis. *Haemostasis* 1982; 12: 282-8.
- [21] Kindsfater K, Lowe T, Lawellin D, *et al.* Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1186-92.

- [22] Machida M, Dubousset J, Imamura Y, *et al.* Melatonin. A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996; 21: 1147-52.
- [23] Machida M, Dubousset J, Yamada T, *et al.* Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6 mice without pinealectomy. *J Pineal Res* 2006; 41: 1-7.
- [24] Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-95.
- [25] Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, *et al.* Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72: 2183-98.
- [26] Nosjean O, Ferro M, Coge F, *et al.* Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275: 31311-7.
- [27] Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66: 19-26.
- [28] Moreau A, Wang DS, Forget S, *et al.* Melatonin Signaling Dysfunction in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine* 2004.
- [29] Strassheim D, Malbon CC. Phosphorylation of Gi alpha 2 attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 14307-13.
- [30] Papaioannou S, Tumber AM, Meikle MC, *et al.* G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1449: 284-92.
- [31] Oegema TR, Jr., Bradford DS, Cooper KM, *et al.* Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines. *Spine* 1983; 8: 378-84.
- [32] Duance VC, Crean JK, Sims TJ, *et al.* Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* 1998; 23: 2545-51.

- [33] Yu J, Fairbank JC, Roberts S, *et al.* The elastic fiber network of the anulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine* 2005; 30: 1815-20.
- [34] Bagnall KM, Beuerlein M, Johnson P, *et al.* Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis. *Spine* 2001; 26: 1022-7.
- [35] Brodner W, Krepler P, Nicolakis M, *et al.* Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82: 399-403.
- [36] Morcuende JA, Minhas R, Dolan L, *et al.* Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28: 2025-8.
- [37] Wise CA, Barnes R, Gillum J, *et al.* Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25: 2372-80.
- [38] Chan V, Fong GC, Luk KD, *et al.* A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 401-6.
- [39] Alden KJ, Marosy B, Nzegwu N, *et al.* Idiopathic scoliosis: identification of candidate regions on chromosome 19p13. *Spine* 2006; 31: 1815-9.
- [40] Shapirov RN, Zaidman AM, Zorkol'tseva IV, *et al.* [Polymorphism of aggrecan gene in families with idiopathic scoliosis]. *Mol Biol (Mosk)* 2006; 40: 554-7.
- [41] Bashirdes S, Veile R, Allen M, *et al.* SNTG1, the gene encoding gamma1-syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis. *Hum Genet* 2004; 115: 81-9.

Figure 1 A : Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPc dans les ostéoblastes humains. Effet de doses croissantes de mélatonine (10^{-11} à 10^{-5} M) sur les niveaux d'AMPc intracellulaire induit par la stimulation de l'activité adénylate cyclase par la forskolin (10^{-5} M) dans les ostéoblastes dérivés de patients scoliotiques. Les courbes d'inhibition ont permis de classer les patients SIA en trois groupes fonctionnels. Le groupe 1 montre une augmentation des niveaux d'AMPc au lieu d'une diminution comme on l'observe dans le groupe contrôle. Dans le groupe 2, on n'observe presque pas d'inhibition, alors que les cellules des patients du groupe 3 montrent une réponse partielle.

B : défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA. La mélatonine peut se lier à ses récepteurs membranaires MT1 ou MT2 (principalement présents à l'état d'hétérodimères). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines Gi (G inhibitrices) qui, une fois activées, inhibent l'activité des adénylates cyclases. Chez les patients SIA, les sous-unités $G\alpha$ des protéines Gi sont phosphorylées dans les résidus sérine, ce qui prévient la formation de trimères avec les sous-unités $\beta\gamma$, ce qui induit leur inactivation et leur incapacité à inhiber l'activité des adénylates cyclases. La phosphorylation des protéines Gi a été démontrée chez les patients SIA par Moreau et coll. [28].

Figure 2. Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients scoliotiques. Représentation schématique des effets physiologiques de la mélatonine chez les sujets normaux et leurs liens avec les pathologies observées chez les patients SIA. La figure de gauche présente les tissus ciblés par l'action de la mélatonine. Une défaillance de la signalisation de cette hormone dans ces systèmes pourrait expliquer la

majorité des anomalies et des symptômes observés chez les patients SIA (figure de droite), ce qui confère à ce modèle la portée d'un concept unificateur pour expliquer l'étiologie de la SIA.

Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA

Facteurs neurologiques et musculaires	
<i>Système nerveux central</i>	Destruction de l'hypothalamus Anomalies de proprioceptions
<i>Musculature spinale</i>	Distribution différentes des fibres
Facteurs biochimiques	
<i>Plaquettes sanguines</i>	Calcium et phosphore intracellulaire élevé Taux augmenté de calmoduline
Protéines structurales	
<i>Fibrilline</i>	Désorganisation des fibres
<i>Collagène / Protéoglycanes</i>	Dégénération du collagène Accumulation d'agrégats de protéoglycanes
<i>Collagène</i>	Altération de la composition des protéoglycanes Facteur non confirmé Réduction des liaisons des fibres de collagène
<i>Fibres élastiques</i>	Changements de morphologie discale
Facteurs endocriniens	
<i>Mélatonine</i>	Déficiences en mélatonine Déficiences en mélatonine Pas de variation significative Variants alléliques du récepteur de la mélatonine 1A : pas de corrélation avec le phénotype Défaut de la voie de signalisation de la mélatonine

Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA (suite)

Facteurs génétiques		
Locus	6q	[37]
	distal 10q	
	18q	
	19q13.3	[38]
	2q13	
	2q14.3	
	2q21.1	
	2q22.3	
	17p12	[8]
	17p11.2	
	Xq23	[7]
	Xq24	
	Xq25	
	Chromosome 6	[11]
	Chromosome 9	
	Chromosome 16	
	Chromosome 17	
	19p13	[39]
Gènes	aggrécane	[40]
	SNTG1	[41]

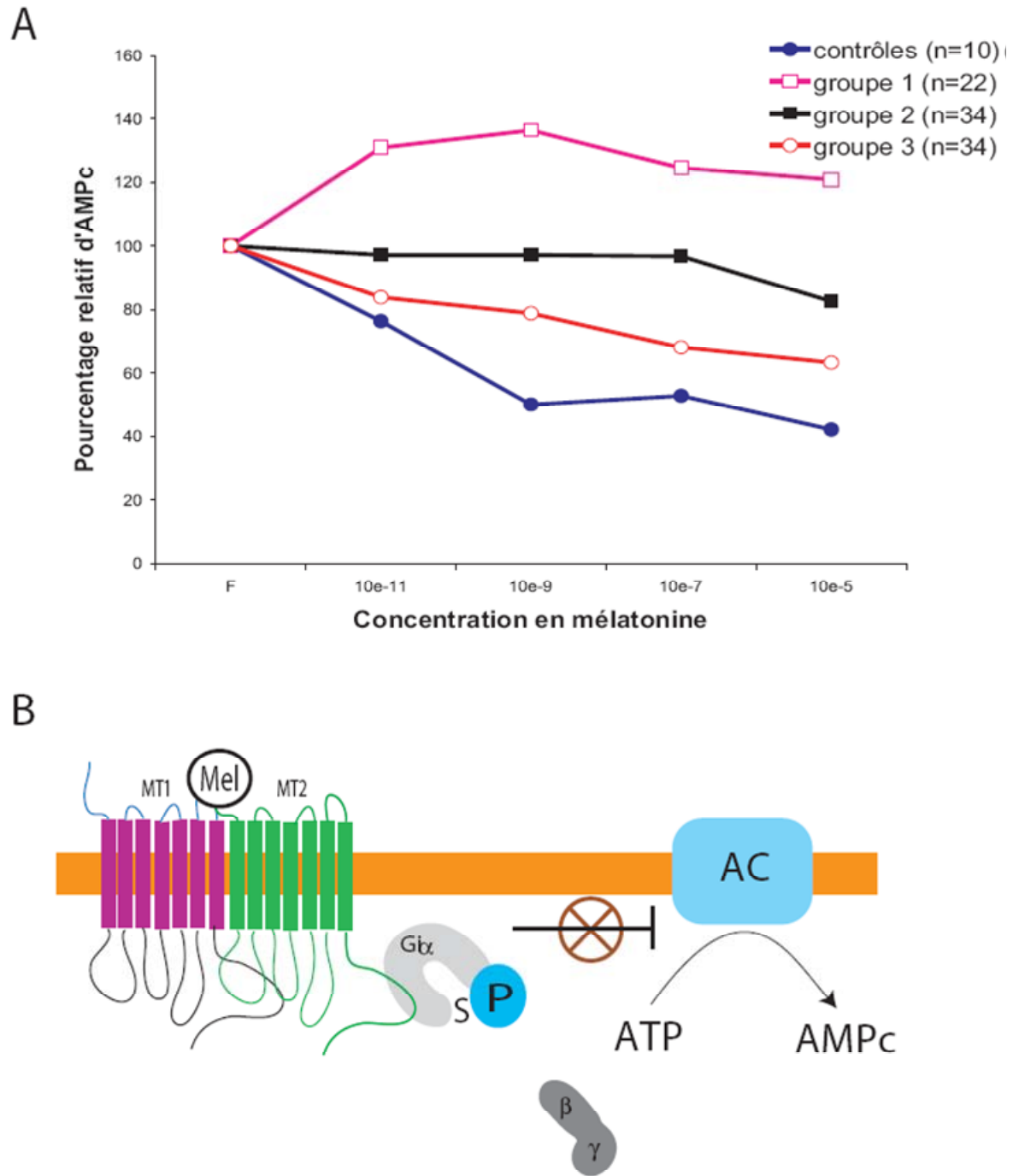


Figure 1. A. Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPc dans les ostéoblastes humains. B : défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA.

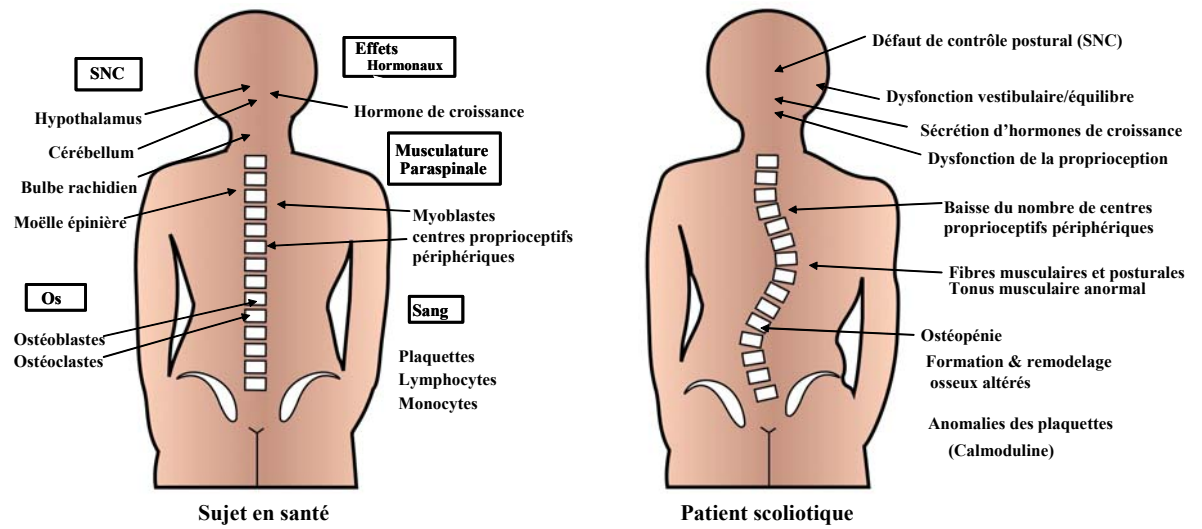


Figure 2. Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients scoliotiques.

Nouvelle approche pour l'analyse de la voie de signalisation de la mélatonine

La découverte du défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients scoliotiques a été réalisée en utilisant une technique simple mais relativement lourde et qui présente certains inconvénients. Premièrement, il est nécessaire de stimuler la production d'AMPC par les adénylates cyclases avec la forskoline afin de pouvoir mesurer son inhibition suite au traitement avec la mélatonine, ce qui peut causer une imprécision. D'un autre côté il est difficile d'analyser un grand nombre d'échantillons vu la lourdeur du protocole expérimental, et finalement il n'est pas possible d'automatiser cette technique. Afin de contrer ces limites et confirmer les résultats obtenus, nous avons pris avantage de l'avènement d'une nouvelle technologie qu'est la spectroscopie cellulaire diélectrique (SCD). La SCD est basée sur une technologie bien connue, celle de la bio-impédance, qui exploite les propriétés physiques et électriques des cellules vivantes et des tissus biologiques (Ehret & coll. 1997). Cette technique consiste à appliquer un courant alternatif à des fréquences précises sur les cellules, puis mesurer à l'aide de deux électrodes le courant généré. À chaque fréquence, la différence de l'amplitude du signal réfléchi par rapport au signal incident est mesurée (Ciambrone & coll. 2004). Cette technique a été appliquée avec succès à plusieurs processus tels que l'évaluation de la conductivité des membranes cellulaires, la migration et la morphologie cellulaire (Gheorghiu 1996; Wegener & coll. 1999).

Plusieurs chercheurs ont tenté d'élucider les propriétés diélectriques des cellules intactes et des membranes cellulaires afin d'utiliser la bio-impédance pour étudier de manière non invasive le comportement cellulaire suite à un changement physiologique.

D'ailleurs il a été démontré que cette technique peut être utilisée pour évaluer le nombre, la viabilité et la prolifération cellulaire (Ehret & coll. 1998). De plus, d'autres chercheurs ont utilisé la bio-impédance pour investiguer les interactions ligand-récepteur puisque la liaison du ligand sur son récepteur induit un changement des propriétés diélectriques des cellules (Santini & coll. 1994; Steinem & coll. 1997; Wegener & coll. 1999). Par contre ces études n'ont pas permis de démontrer l'existence d'une réponse spécifique selon le type de récepteur stimulé.

Plus récemment, une autre application de la bio-impédance ou de la SCD a vu le jour. Il s'agit d'une amélioration de la technique utilisée pour étudier les interactions ligand-récepteur et qui consiste à utiliser au lieu d'une seule fréquence, un large spectre de fréquences variant entre 1 KHz et 10 MHz. Cette technique mesure les conséquences cellulaires de l'activation de récepteurs (endogènes ou transfectés) par des ligands spécifiques sans avoir recours au marquage du ligand ou du récepteur. De plus, les mesures sont effectuées en temps réel et peuvent s'appliquer à tous les types de récepteur, y compris les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs nucléaires (Peters & coll. 2007). L'application de cette technique est facilitée par la conception d'un nouvel appareil nommé CellKey^{TM1} (Fig. 3A). Ce système est automatisé et peut prendre en charge des plaques de 96 ou 384 puits. Ces plaques sont munies de deux électrodes au fond de chaque puits (Fig.3B). L'appareil CellkeyTM applique un faible voltage sur la couche cellulaire et effectue des mesures à 24 différentes fréquences. Aux basses fréquences l'impédance mesurée est celle extracellulaire (dZiec), par contre à hautes fréquences c'est l'impédance intracellulaire qui est mesurée (dZitc) (Fig. 3C). Les mesures sont effectuées toutes les deux secondes pendant une période d'au

¹ CellKey est une marque de commerce de MDS Sciex Ltée

moins 10 min. Les données brutes sont analysées par le logiciel fourni avec l'appareil afin de les convertir en tableaux et courbes faciles à interpréter, mais les données brutes restent accessibles pour d'autres fins.

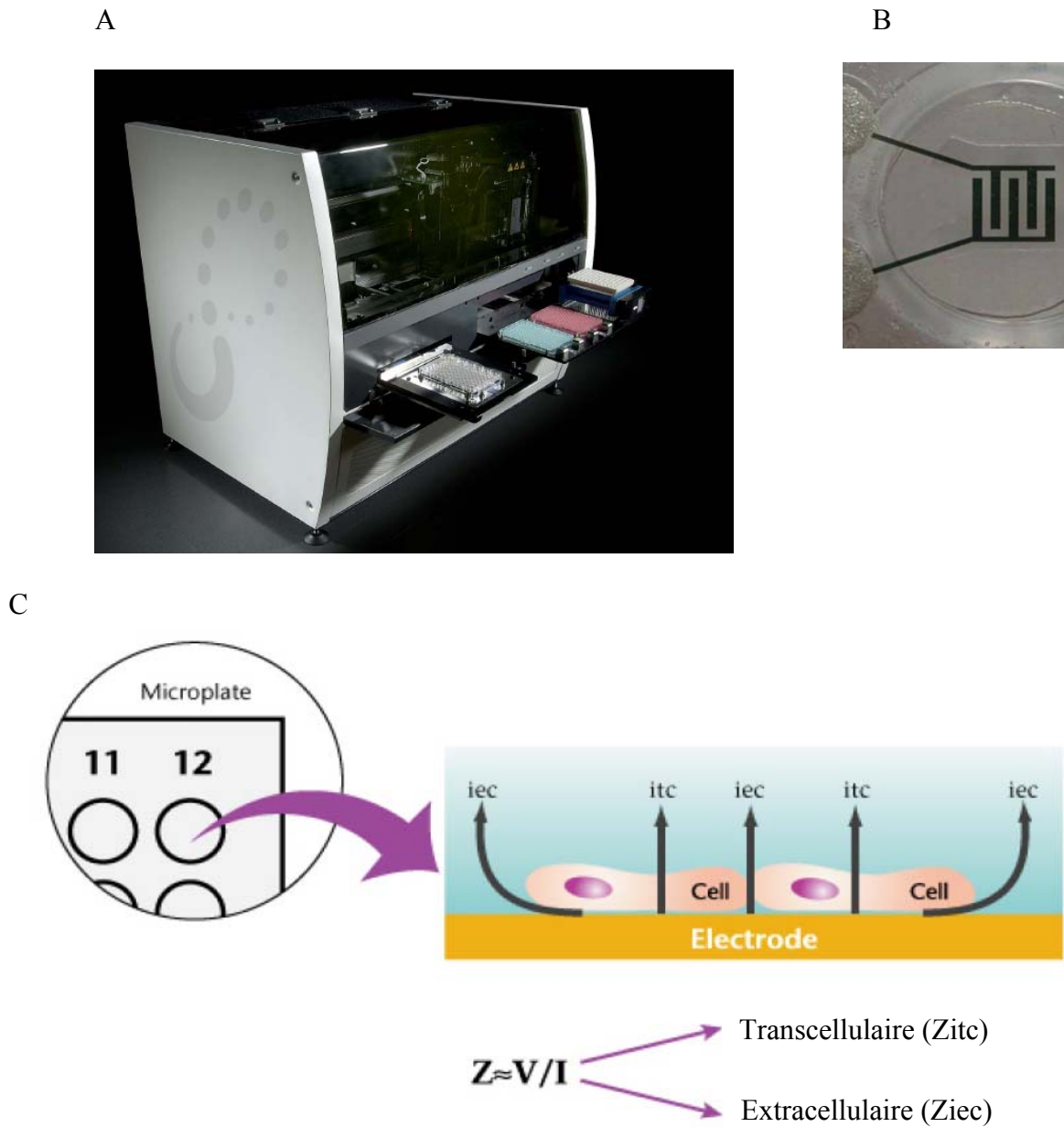


Figure 3. Appareil CellKey™. A. Vue globale du système CellKey™, B. photo d'un puit d'une plaque 96 puits standard utilisé pour le CellKey™ et qui montre la disposition des deux électrodes au fond du puit. C. Schema représentant les deux types d'impédances mesurées par le CellKey™

Régulation de la voie de signalisation de la mélatonine

La mélatonine est synthétisée principalement dans la glande pinéale à partir du tryptophane. Sa synthèse est contrôlée par la lumière et se déroule pendant la période nocturne. Cette synthèse passe par une première étape de transformation du tryptophane en sérotonine, réaction catalysée par deux enzymes ubiquitaires soit la tryptophane hydroxylase et la décarboxylase. Donc la sérotonine peut être synthétisée dans plusieurs tissus alors que la distribution des deux autres enzymes impliquées dans la cascade transformant la sérotonine en mélatonine (N-acétyltransférase et l'hydroxyindole-O-méthyltransférase) est limitée à certains tissus spécialisés dans la synthèse de la mélatonine (Vanecek 1998).

La mélatonine est distribuée aux différents tissus via le flux sanguin et exerce son action sur les cellules par l'intermédiaire de récepteurs de la mélatonine (Vanecek & coll. 1987). La régulation des voies de signalisation de la mélatonine est complexe puisqu'elle doit tenir compte de plusieurs paramètres. Nous avons d'un côté la diversité des récepteurs de la mélatonine et d'un autre côté leur localisation multiple dans un grand nombre de tissus cible. S'ajoute à cela les variations des taux de mélatonine de façon circadienne et saisonnière (Pandi-Perumal & coll. 2008).

Cette régulation peut intervenir à différents niveaux de la cascade et implique plusieurs protéines régulatrices dont la plupart sont des kinases (PKC, PKA), des phosphatases (PP1A, PP2B) ou des protéines régulatrices qui modulent les interactions protéine-protéine (protéines d'échafaudage telle que AKAP).

Régulation de la signalisation de la mélatonine par phosphorylation

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont parmi les cibles pouvant être phosphorylées soit par des sérine/thréonine kinases (Freedman & Lefkowitz 1996) ou bien des tyrosine kinases (Malbon & Karoor 1998). Cette phosphorylation intervient lors du phénomène de désensibilisation, un mécanisme utilisé par les cellules pour contrer une stimulation prolongée par un ligand. Les résidus phosphorylés forment un domaine de liaison avec des β -arrestines. Ces protéines se lient au récepteur et induisent un arrêt du signal transmis par celui-ci. Ce mécanisme implique un découplage des protéines G et/ou une internalisation du récepteur (Krupnick & Benovic 1998).

Dans le cas des récepteurs à mélatonine, on observe *in vitro* une désensibilisation après une stimulation de 5h et plus alors que les niveaux élevés de mélatonine sont maintenus chez l'homme durant 8h (Reiter 1991). La désensibilisation des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 peut être homologue, c'est-à-dire que la persistance de la stimulation par la mélatonine va induire l'activation des kinases responsables de la phosphorylation des récepteurs qui vont phosphoryler leurs cibles et ainsi induire la désensibilisation. Par contre lors de la désensibilisation hétérologue, ces kinases sont activées par une autre voie qui est indépendante de la mélatonine comme les variations des photopériodes et en réponse aux estrogènes (Witt-Enderby & coll. 2003).

Plusieurs kinases ont été rapportées de part leur implication dans la phosphorylation des GPCR. Parmi les plus étudiées, on retrouve des sérine/thréonine kinases notamment la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) (Freedman & Lefkowitz 1996). Ces

deux kinases jouent un rôle déterminant dans plusieurs voies de signalisation. Il existe aussi une famille de kinases spécifique pour les GPCR : les GRKs (G-protein coupled Receptor Kinase) (Bunemann & Hosey 1999). C'est une famille qui comprend six membres dont l'expression varie d'un tissu à l'autre (Spurney & coll. 2002).

Peu de choses sont connues sur les mécanismes de déphosphorylation des récepteurs couplés aux protéines G par les phosphatases. Les études effectuées sur les récepteurs β -adrénergiques montrent que ces récepteurs sont déphosphorylés par une phosphatase de la famille des protéines phosphatases PP-2A (Lefkowitz & coll. 1998). Cette déphosphorylation nécessite un pH acide ce qui implique que cette réaction est effectuée à l'intérieur des vésicules après internalisation des récepteurs. Chez la Drosophile, une phosphatase codée par le gène *rdgC* (retinal degeneration C) a été isolée. C'est une sérine/thréonine phosphatase capable de déphosphoryler la rhodopsine. Sa séquence N-terminale présente une forte homologie avec le domaine catalytique des protéines phosphatases PP1, 2A et 2B (Vinos & coll. 1997).

Un autre niveau de régulation de la voie de signalisation de la mélatonine par phosphorylation est la phosphorylation des protéines G_i . En effet plusieurs évidences montrent que cette modification s'effectue au niveau des sous-unités α (Houslay & coll. 1990). Les études effectuées sur $G_{\alpha i-2}$ montrent que cette protéine est inactivée par une phosphorylation dépendante de la protéine kinase C (Bushfield & coll. 1990). En effet l'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs de PKC a montré que l'activité de PKC est proportionnelle à l'activité inhibitrice de $G_{\alpha i-2}$ sur les adénylates cyclases (Strassheim & Malbon 1994). Les analyses par phosphoamines ont montré que dans la majorité des cas, c'est une phosphorylation de résidus sérine qui est mise en jeu (Bushfield & coll. 1990).

La PKC peut aussi phosphoryler Gaz sur des résidus sérine Ser¹⁶ et Ser²⁷ dans la partie N-terminale de ces protéines (Lounsbury & coll. 1993).

Régulation par des interactions protéine – protéine

Les interactions protéine-protéine sont très importantes pour la régulation d'une multitude de voies de signalisation. La transmission du signal implique l'activation de protéines en cascade et ceci nécessite un contact direct entre ces protéines. Ce rôle est facilité par l'existence dans différentes protéines de domaines protéiques capables d'interagir entre eux. Toutefois, à la complexité de ces interactions s'ajoute la possibilité de retrouver différents partenaires d'interaction dans différents compartiments cellulaires en fonction de différents stimuli ou du cycle cellulaire. Afin que ces protéines interagissent entre elles, elles doivent être présentes dans le même compartiment, ceci est facilité par l'existence de transporteurs ou protéines d'échafaudage pouvant transloquer une protéine d'un compartiment subcellulaire à un autre. L'autre niveau de complexité est qu'une protéine peut interagir avec plusieurs partenaires et ainsi activer différentes voies de signalisation selon le complexe formé. La découverte des protéines d'échafaudage a permis de mieux comprendre les mécanismes que les cellules ont développés pour contrer ces difficultés (Lester & Scott 1997). La régulation de la voie de signalisation de la mélatonine par ces protéines est encore peu étudiée.

Dimérisation des récepteurs à mélatonine et interaction avec d'autres récepteurs

Plusieurs études réalisées dans différentes lignées cellulaires et avec différentes techniques et différents GPCR ont montré que des GPCR sont capables de se dimériser

entre eux, formant soit des homodimères mais aussi des hétérodimères aux propriétés différentes de celles des deux récepteurs sous leur forme monomérique (Prinster & coll. 2005). Plusieurs de ces études ont montré l'implication de la dimérisation à plusieurs niveaux de la régulation de l'activité biologique des GPCR comme leur biosynthèse, leur maturation, leur activation et leur régulation (Milligan & coll. 2006).

Les récepteurs de la mélatonine n'échappent pas à cette règle, en effet Ayoub & coll. ont analysé la dimérisation des récepteurs MT1 et MT2 par la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) et ont montré que les récepteurs MT1 et MT2 existent principalement sous forme d'hétérodimères (Ayoub & coll. 2004). Ils ont montré que cette dimérisation est constitutive, c'est-à-dire que les récepteurs forment des dimères en absence ou en présence d'une stimulation par un ligand (Ayoub & coll. 2004). Par contre la signification biologique de cette dimérisation n'est pas encore bien élucidée.

La dimérisation des GPCR est d'autant plus intéressante depuis la découverte de la dimérisation de certains récepteurs bien caractérisés avec des récepteurs orphelins. L'un des multiples exemples de ce phénomène est la liaison du récepteur GPR50 aux récepteurs MT1 et MT2. Le GPR50 est un récepteur orphelin orthologue humain du récepteur de la mélatonine Mel1C identifié chez le poulet et xénope (Dufourny & coll. 2008). Il possède 45% d'homologie avec les récepteurs MT1 et MT2 (Ivanova & coll. 2008). Cependant il est incapable de lier la mélatonine et aucun ligand n'a été identifié pour ce récepteur d'où sa classification comme récepteur orphelin bien qu'il semble jouer un rôle au niveau du métabolisme, ce qui a été mis en évidence par l'étude de souris déficientes en GPR50 (Ivanova & coll. 2008). Le récepteur GPR50 peut se dimériser avec les récepteurs MT1 et MT2. Cette dimérisation n'a pas d'effet sur le récepteur MT2 mais elle induit l'inhibition

complète du récepteur MT1 (Levoye & coll. 2006). Ce mécanisme pourrait faire partie de la régulation des récepteurs de la mélatonine en inhibant la signalisation via le récepteur MT2 mais aussi en compétitionnant pour la formation d'hétérodimères (Levoye & coll. 2006).

Contribution des protéines d'échafaudage

AKAP (A-Kinase Anchoring Protein) est l'une des protéines d'échafaudage pouvant interagir avec les GPCR. AKAP possède plusieurs domaines de liaison protéiques, ce qui lui permet de lier plusieurs protéines à la fois. Cette protéine peut lier et transloquer vers la membrane plasmique les protéines PKA, PKC et la calcineurine (PP2B) (Coughlan & coll. 1995). AKAP se lie aussi aux récepteurs GPCR (Malbon & coll. 2004; Higashida & coll. 2005). Cette protéine joue un rôle important surtout pour les protéines régulées par phosphorylation et déphosphorylation puisque elle lie des kinases et des phosphatases (Oliveria & coll. 2003).

Rack1 joue également un rôle de protéine d'échafaudage et partage certaines propriétés avec l'AKAP (Edwards & Scott 2000). Cette protéine joue un rôle dans la communication entre la voie des PKC et celle de l'AMPc (McCahill & coll. 2002). Rack1 ne lie que la forme active de PKC et est responsable de sa translocation d'un compartiment cellulaire à un autre tel que la membrane plasmique où PKC peut exercer son action en phosphorylant les récepteurs ainsi que les protéines G (Ron & Mochly-Rosen 1994; Chuang & coll. 1996). Rack1, par sa fonction de protéine d'échafaudage pouvant transloquer PKC à la membrane cytoplasmique, peut jouer un rôle important dans la signalisation des protéines G. Rack1 interagit avec une multitude de protéines, dont entre

autres des kinases de la famille Src (Chang & coll. 1998), une tyrosine phosphatase PTP μ (Mourton & coll. 2001). PTP μ est un récepteur tyrosine phosphatase impliqué dans les complexes d'adhésion via des interactions homophiliques. PTP μ peut être recruté par la protéine d'échafaudage Rack1 dans ces complexes d'adhésion où il peut interagir avec d'autres protéines (Rosdahl & coll. 2002).

Les protéines kinases C

Classification des PKCs

Les protéines kinases C forment une grande famille de protéines sérine/thréonine kinases comprenant 11 membres (Mellor & Parker 1998). Les membres de cette famille de kinases sont subdivisés en trois sous-familles, soit les PKCs conventionnelles, les nouvelles PKCs et les PKCs atypiques. Ces sous-familles diffèrent d'une part de leur structure et surtout de leurs propriétés enzymatiques. La sous-famille des PKCs conventionnelles se compose de quatre isoformes, α , β I, β II et γ . Elles sont activées à la fois par le calcium, le phosphatidylsérine (PS) et le diacylglycerol (DAG). Les nouvelles PKCs contenant les isoformes η , ϵ , δ et θ sont activées par le DAG mais sont insensibles au PS et au calcium. Finalement les PKCs atypiques (ι et ζ) ne sont activées ni par le calcium ni par le DAG, mais restent sensibles au PS (Mellor & Parker 1998). Les PKCs peuvent aussi être activées directement par le phorbol ester (Castagna & coll. 1982), ainsi que par plusieurs stimuli, entre autres la mélatonine (Benitez-King 2000), les estrogènes (Qiu & coll. 2003) et par une phosphorylation sur des résidus tyrosine médiée par Src (Joseloff & coll. 2002).

Structure des PKCs et leur régulation

La structure protéique de tous les PKCS se compose d'un domaine catalytique et d'un domaine régulateur liés entre eux par une structure charnière (Fig.4) (Mellor & Parker 1998). Le domaine régulateur est responsable de la liaison des cofacteurs à l'enzyme et détermine ainsi les différences existantes entre les isoformes des PKCs. Ce domaine se compose de plusieurs régions protéiques. Le domaine C1 est présent dans toutes les PKCs, il contient les sites de liaison du DAG et du phorbol esters, cependant le domaine C1 des PKCs atypiques est incapable de lier le DAG (Kheifets & Mochly-Rosen 2007). Le domaine C2 contient le site de liaison au calcium et est présent dans les membres des PKCs conventionnelles. Le pseudo-substrat est une courte séquence d'acides aminés présente dans les trois sous-familles des PKCs. Cette séquence ressemble au site de phosphorylation présent sur les substrats des PKCs sauf que le résidu à être phosphorylé (sérine ou thréonine) est remplacé par une alanine. Le pseudo-substrat imite le motif de reconnaissance du substrat et bloque ainsi l'accès au domaine catalytique. L'activation des PKCs induit sa translocation vers la membrane et la libération du pseudo-substrat ce qui permet la liaison de l'enzyme à son substrat (Kheifets & Mochly-Rosen 2007).

Le domaine catalytique est très conservé entre les différentes isoformes et partage une forte homologie avec le domaine catalytique d'autres sérine/thréonine kinases. Il est composé de deux domaines, un domaine C3 qui lie l'ATP et un domaine C4 responsable de la liaison du substrat (Kheifets & Mochly-Rosen 2007). La région V3 constitue la séquence charnière entre le domaine régulateur et le domaine catalytique. Elle constitue un site de clivage ciblé par plusieurs protéases. Le clivage des PKCs à ce niveau est régulé principalement par phosphorylation et induit la libération d'un domaine catalytique

constitutivement actif (Steinberg 2004). Au niveau C-terminal, les PKCs contiennent une région V5 qui joue un rôle important pour la régulation de l'activité kinase des PKCs, il contient aussi une séquence de localisation nucléaire permettant la translocation au noyau de certaines isoformes des PKCs (Kheifets & Mochly-Rosen 2007).

La régulation des PKCs s'effectue principalement par des modifications post-traductionnelles (MPTs). Suite à sa traduction, l'enzyme subit des MPTs induisant la phosphorylation de plusieurs sites thréonine au niveau de la boucle d'activation. Il a été montré que cette phosphorylation s'effectue par la PDK1 puisque en présence d'un dominant négatif des PDK1 les PKCs ne sont plus activées (Sonnenburg & coll. 2001). La phosphorylation au niveau des résidus tyrosine n'est pas indispensable à toutes les isoformes. Elle est essentielle pour l'activité des PKC δ qui peuvent être phosphorylées au niveau des plusieurs résidus tyrosine par Src ou bien Ras (Steinberg 2004).

À l'état inactif la plupart des PKCs sont localisés dans le cytosol. Une fois activées par un signal en amont, elles sont transloquées vers la membrane plasmique où elles possèdent plusieurs substrats. Cette translocation est médiée par une protéine d'échafaudage nommée Rack1 (Receptor for Activated Protein Kinase C 1) qui ne lie que la forme active de PKC (Schechtman & Mochly-Rosen 2001).

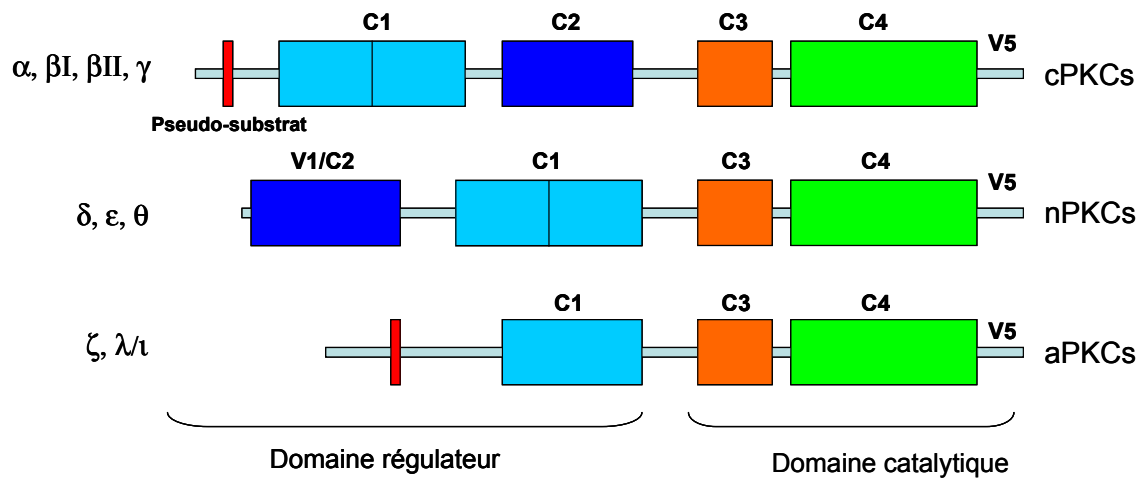


Figure 4. Structure des différentes isoformes des PKCs. Adaptée de Kheifets & Mochly-Rosen 2007.

Fonctions biologiques des PKCs

Les PKCs sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation intervenant ainsi dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques. Notamment la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la survie cellulaire, le métabolisme, la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire (revue dans (Mackay & Twelves 2007)). Cette multitude de rôles est expliquée par l'existence de plusieurs isoformes des PKCs, la multitude de leurs activateurs, leur localisation dans différents compartiments subcellulaires ainsi que par le grand nombre de substrat que les PKCs peuvent phosphoryler.

L'implication des PKCs dans le processus de la tumorigénèse et dans les cancers constitue le rôle le plus étudié. Les différentes isoformes des PKCs ont des rôles distincts voir même opposé dans la tumorigénèse (Papp & coll. 2004). En effet, plusieurs études ont montré que certains activateurs des PKCs tels que le phorbol ester sont cancérigènes (Nishizuka & Kikkawa 2003). Des études fonctionnelles ont prouvé que l'activation des isoformes PKC α et PKC β induisent la carcinogenèse et maintiennent le phénotype tumoral (Jiang & coll. 2004; Koivunen & coll. 2006). Par contre le PKC δ possède un effet anticancéreux en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Perletti & coll. 2005). En raison de la multitude des rôles des PKCs, leurs principales fonctions biologiques seront résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principales fonctions biologiques des PKCs

Système	Rôle de PKC	Référence
Musculature	Stimule la contraction musculaire	Nielsen & coll. 2003
	Active la liaison et la dispersion des cellules musculaires via leur interaction avec les intégrines	Disatnik & coll. 2002
Système nerveux	Certaines isoformes induisent l'apoptose et l'inflammation	Nelson & Alkon 2009
	effet protecteur en inhibant l'apoptose des neurones et en stimulant la maturation des synapses	Hongpaisan & Alkon 2007
Récepteurs couplés aux protéines G	Phosphorylation et désensibilisation des GPCR	Murthy & coll. 2000
Os	Stimule la différenciation en induisant la voie des TGFb et les BMP-2	Palcy & Goltzman 1999

Cibles potentielles du défaut de signalisation de la mélatonine

La signalisation de la mélatonine est présente dans une multitude de systèmes biologiques et de cellules où elle médie les divers rôles physiologiques de cette hormone. Cette signalisation passe via la modulation de l'AMPc qui est le principal second messenger de la cellule puisqu'il est impliqué dans un grand nombre de voies de signalisation. D'où la problématique de définir la ou les molécule(s) affectée(s) par le défaut de la signalisation de la mélatonine observée dans la SIA. Afin d'y remédier, nous avons cherché dans la littérature des molécules régulées par la mélatonine et ayant un rôle dans l'un des systèmes affectés dans la SIA. Parmi un certain nombre de candidats, nous avons identifié l'ostéopontine. C'est une glycoprotéine qui joue un rôle important comme mécanorécepteur, celle-ci étant exprimée dans les fuseaux neuromusculaires et l'oreille interne, deux structures jouant un rôle primordial dans la proprioception, le contrôle postural et la fonction vestibulaire. Toutes ces fonctions sont affectées dans la SIA.

Roth & coll. ont montré que la mélatonine *in vitro* stimule la synthèse de l'OPN dans les ostéoblastes (Roth & coll. 1999), par contre plusieurs évidences montrent qu'*in vivo* la mélatonine inhibe l'expression de l'OPN. Premièrement Aherrahrou & coll. ont montré que les taux d'OPN plasmatique sont plus élevés chez les souris C57Bl/6 comparativement aux souris C3H (Aherrahrou & coll. 2004). Il a été montré que les souris C57Bl/6 présentent une déficience partielle en mélatonine à cause d'une mutation au niveau de l'enzyme principale de la synthèse de la mélatonine soit la N-acétyltransférase (Goto & coll. 1989). Par contre les souris C3H sont des super-productrices de mélatonine (von Gall & coll. 2000). D'un autre côté, la mélatonine induit la synthèse du GMPc, qui active la

kinase dépendante du GMPc (Vanecek & Vollrath 1989), cette kinase peut inhiber la synthèse de l'OPN (Dey & coll. 1998). Finalement les résultats présentés dans cette thèse prouvent que nous sommes sur la bonne piste et que l'OPN est essentielle au développement de la SIA.

Ostéopontine

L'ostéopontine (OPN) est une glycoprotéine phosphorylée initialement identifiée à partir du cortex osseux de bœuf (Franzen & Heinegard 1985) (du grec Osteo=os et pontin=pont) et considérée comme une protéine structurale faisant un pont entre les cellules et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de sa séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) et le motif polyacide aspartique présent dans la séquence primaire de la protéine (Oldberg & coll. 1986). L'OPN a plusieurs appellations dépendamment du site où elle a été découverte. Il a d'abord été proposé par Senger (Senger & coll. 1979) que la phosphoprotéine (nommée 2ar) n'était sécrétée que par les cellules transformées et différenciées issues de lignées de mammifères. Patarca & coll. ont démontré que l'OPN joue un rôle important dans le système immunitaire et l'ont nommé Eta-1 (Early T-lymphocyte activation 1) (Patarca & coll. 1989). Elle a été aussi appelée BSP11 (bone sialoprotein II), Spp1 (secreted phosphoprotein I), uropontin (OPN isolée à partir de l'urine) ainsi que lactopontine (OPN du lait). Le comité officiel de nomenclature HUGO, chargé de définir les noms des gènes humains, a choisi le terme secreted phosphoprotein 1 (Spp1) pour l'OPN. Cependant, le terme le plus communément utilisé dans la littérature reste ostéopontine.

Structure du gène

L'OPN fait partie de la famille des SIBLING (Small Integrin-Binding LIgand N-linked Glycoproteins). C'est une famille composée de cinq membres (OPN; dentin matrix protein 1 (DMP1); bone sialoprotein (BSP1); dentin sialophosphoprotein (DSPP) et matrix extracellular phosphoprotein (MEPE)). Les gènes codant pour les protéines de cette famille

s'étalent sur une région de 375 000 pb sur le chromosome 4 de l'homme et le chromosome 5 de la souris. Outre leur implication dans la physiologie de l'os et des dents et leur rôle dans la cancérogenèse, les membres de cette famille présentent des homologies de structure au niveau de leurs gènes respectifs.

Le gène *Spp1* humain, présent en une seule copie, a une longueur de huit kilobases et est composé de 7 exons (Young & coll. 1990; Hijiya & coll. 1994). L'épissage alternatif de ce gène engendre trois isoformes. La première isoforme (OPN-a) code pour la protéine complète. La deuxième (OPN-c) code pour une protéine dépourvue de l'exon 4 et la troisième (OPN-b) diffère par l'absence de l'exon 5 codant pour 14 acides aminés avec plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Saitoh & coll. 1995; O'Regan & Berman 2000; He & coll. 2006). Ces deux dernières isoformes ont été isolées à partir de cellules cancéreuses (He & coll. 2006). Rittling & coll. ont démontré que l'OPN synthétisée par les cellules cancéreuses est principalement sécrétée, ce qui pourrait s'expliquer par le rôle que peut jouer l'exon 4 et 5 dans l'attachement de l'OPN à la matrice extracellulaire (Rittling & coll. 2002).

Régulation transcriptionnelle de l'OPN

L'OPN est exprimée dans une grande variété de cellules incluant entre autres les ostéoblastes, ostéoclastes, cellules épithéliales, cellules musculaires, fibroblastes, fibroblastes embryonnaires, lymphocytes, macrophages, fuseau neuromusculaire et cellules de l'oreille interne (Denhardt & Noda 1998; Sodek & coll. 2000). Cette large expression nécessite une régulation transcriptionnelle très spécifique en fonction du système tissulaire

dans laquelle elle est retrouvée. Cette régulation n'est pas encore bien élucidée dans tous les tissus bien que le promoteur de l'OPN soit déjà caractérisé (Yamamoto & coll. 1995).

La séquence proximale du promoteur de l'OPN (-1 à -250) est très conservée chez les vertébrés (Hijiya & coll. 1994). Tandis que le reste du promoteur ne l'est pas. La région proximale contient les éléments essentiels à la machinerie de transcription de base (une boîte TATA-like, une boîte CCAAT inversée et une boîte GC) (Yamamoto & coll. 1995), un élément AP-1 (activator protein-1), qui est un site de fixation des proto-oncogènes Fos et Jun. Cet élément médie la stimulation de l'expression de l'OPN induite par le phorbol ester (TPA), via l'activation de la kinase PKC (Denhardt & Guo 1993). D'autres éléments de réponse au TPA sont présents dans le promoteur de l'OPN, ceux-ci incluent un élément AP-2, PEA-3 (polyoma enhancer activator) (Denhardt & Guo 1993). PEA-3 est un site de fixation de facteurs de transcription proto-oncogénique de la famille Ets (El-Tanani & coll. 2004). D'autres séquences importantes pour la régulation de la transcription de l'OPN ont été décrites, entre autre : un élément de réponse à la vitamine D (VDRE), un élément de réponse au facteur de transcription CBFA1/Runx2 qui est un régulateur majeur de la différenciation des ostéoblastes, une séquence RAE (Ras activated enhancer) élément de réponse au facteur oncogénique Ras qui pourrait expliquer l'augmentation de l'OPN dans certaines tumeurs (Prince & Butler 1987; Sato & coll. 1998; Denhardt & coll. 2003).

L'expression de l'OPN est modulée par un grand nombre d'hormones, des cytokines ainsi que des facteurs de croissance qui peuvent influencer la transcription du gène, l'épissage de l'ARNm, sa stabilité et sa traduction (Sodek & coll. 2000). Par exemple la vitamine D augmente l'expression de l'OPN dans les cellules osseuses via

l'élément de réponse VDRE présent sur le promoteur de l'OPN (Prince & Butler 1987). Les souris déficientes en vitamine D expriment faiblement l'OPN (Chen & coll. 1999). Dans les macrophages activés, l'expression de l'OPN est induite par les lipopolysaccharides (LPS) et l'oxyde nitrique (NO) (Ashkar & coll. 2000; Takahashi & coll. 2000). Les inducteurs de l'inflammation tels que le $\text{TNF}\alpha$ et l'interleukine 1 augmentent fortement l'expression de l'OPN (Yu & coll. 1999), de même que plusieurs facteurs de croissance et de différenciation tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor), le $\text{TGF}\beta$ (transforming growth factor) et les BMPs (bone morphogenetic proteins) (Denhardt & Noda 1998; Sodek & coll. 2000).

Structure de la protéine

L'OPN est une phosphoglycoprotéine acide et hydrophile. Cette protéine a été clonée et caractérisée chez sept espèces : rat (Oldberg & coll. 1986), souris (Craig & coll. 1989), humain (Kiefer & coll. 1989), porc (Wrana & coll. 1989), bœuf (Kerr & coll. 1991), lapin (Tezuka & coll. 1992) et le poulet (Moore & coll. 1991). Elle est composée de 264 à 317 acides aminés selon les espèces (297 chez la souris et 314 chez l'humain) (Fig.5), d'où un poids moléculaire théorique d'environ 34 kDa. Cependant la plupart des études montrent l'OPN à des poids moléculaires variant de 44 à 75 kDa dû possiblement à des degrés variables de modifications posttraductionnelles (MPTs) que subit l'OPN. Les analyses de structure *in-silico* prédisent que l'OPN a une structure secondaire relativement simple contenant huit hélices alpha et six feuillets beta. Cependant, Fisher & coll. ont démontré que l'OPN en solution aqueuse n'a pas de structure secondaire et que la protéine est flexible ce qui lui permet de se lier facilement à d'autres protéines ou à la matrice extracellulaire (Fisher & coll. 2001).

L'OPN est très riche en sérine, en acide glutamique et en acide aspartique, à eux seuls, ces trois types d'acide aminé constituent plus de 35% de la protéine, ce qui confère à la protéine sa nature acide (Oldberg & coll. 1986; Prince 1989; Sodek & coll. 2000). La plupart de ces résidus sont conservés (Fig.5). En effet, l'alignement des séquences protéiques de l'OPN de différentes espèces a permis de constater une homologie de 19% (67% d'homologie entre la séquence humaine et murine). Plusieurs domaines sont aussi hautement conservés. On retrouve entre autre tel que montré dans la figure 6 :

- une séquence hydrophobe initiale (peptide signal) de 16 acides aminés qui est clivée avant que la protéine ne soit sécrétée.
- Un domaine polyacide aspartique qui permet à la protéine de se lier aux molécules d'hydroxyapatite (Boskey & coll. 1993).
- une séquence de liaison aux intégrines (RGD) qui permet l'attachement de l'OPN aux intégrines et à la matrice extracellulaire.
- Un site de clivage à la thrombine.
- Une séquence de liaison du calcium.

Modifications posttraductionnelles (MPTs)

L'OPN est exprimée dans une grande majorité de tissus où elle interagit avec différents récepteurs afin d'exercer des fonctions biologiques très variées. La régulation de ces interactions passe principalement via des MPTs. En effet, plusieurs études ont montré l'existence de différentes formes de l'OPN isolées à partir de divers tissus et qui diffèrent par leur degré de MPTs. Ces modifications peuvent avoir des effets significatifs sur la structure de la protéine, par exemple la phosphorylation ou la sulfatation vont augmenter la charge négative de la protéine, alors que la glycosylation va augmenter la rigidité de la molécule et la rendre moins flexible.

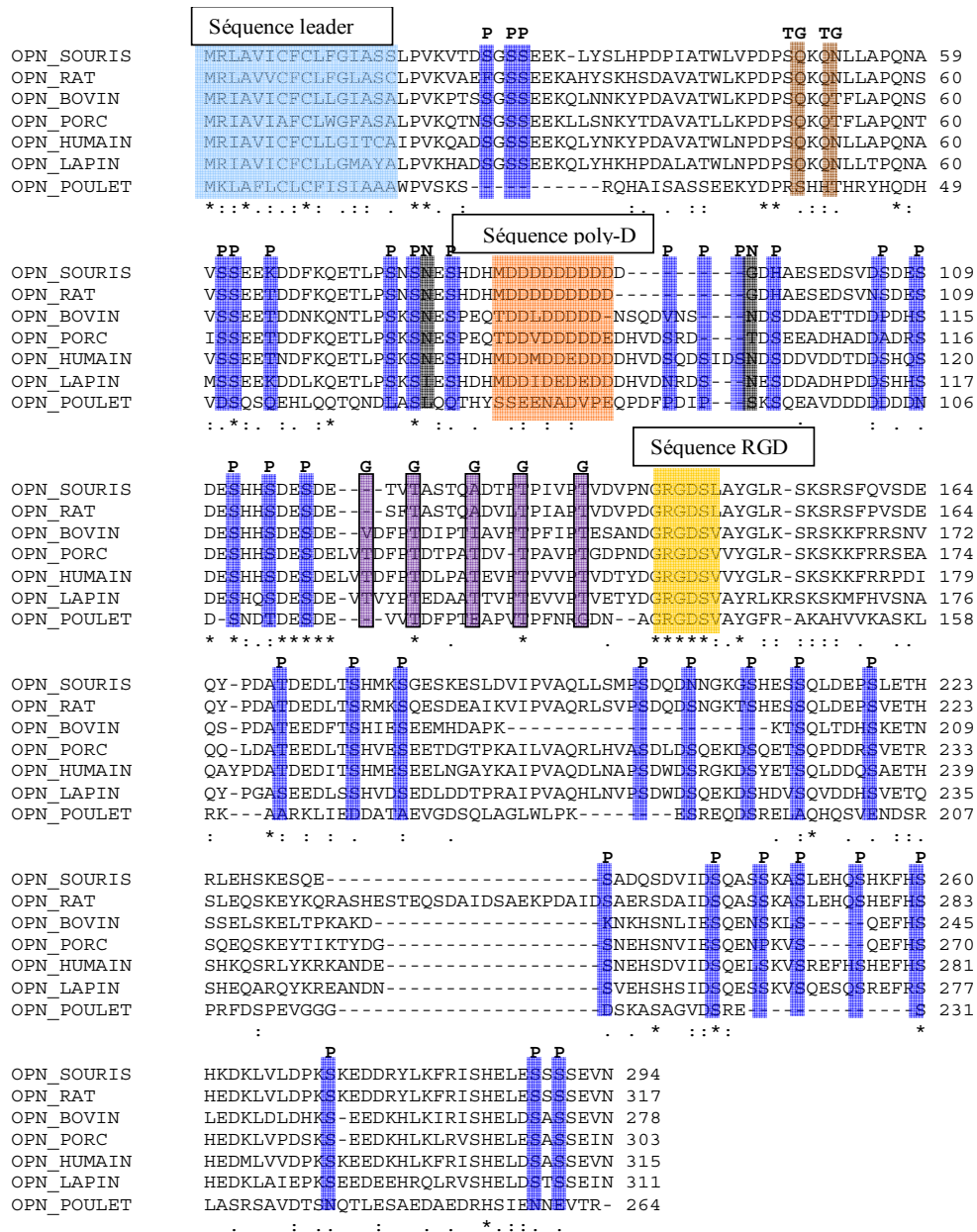


Figure 5. Alignement des séquences protéiques d'OPN de différentes espèces. La localisation des différents résidus phosphorylés (P), N-glycosylés (N), O-glycosylés (G) et transglutaminés (TG) ainsi que la séquence du peptide signal et du motif RGD, la position des différents résidus est basée sur la séquence de l'OPN humain, adapté de (Christensen & coll. 2005).

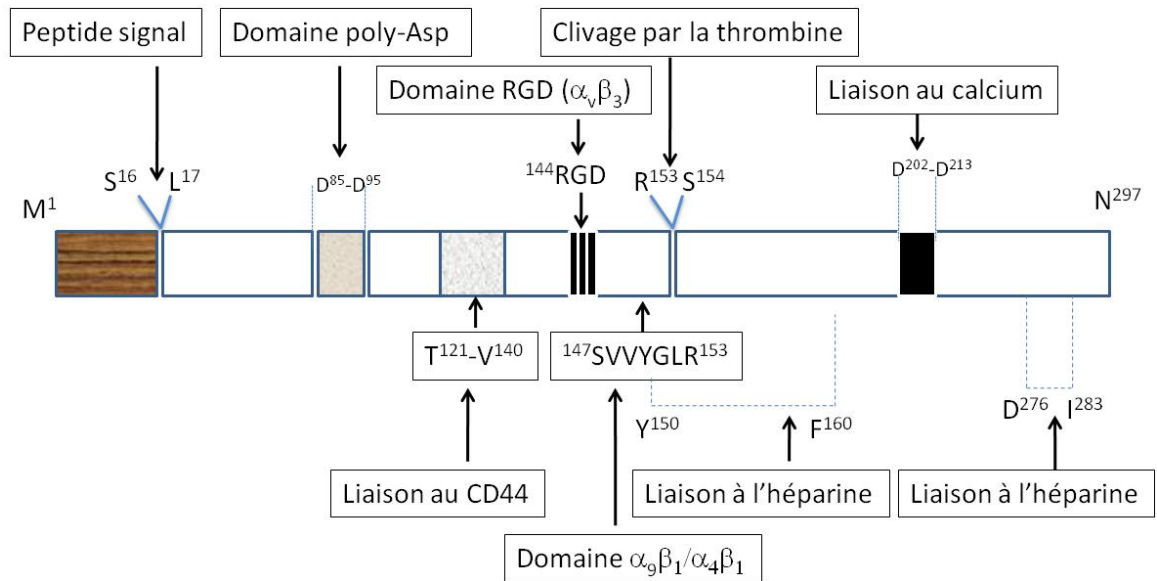


Figure 6. Représentation schématique des différents domaines protéiques de l'OPN.

Les chiffres indiquent l'emplacement des résidus selon la séquence de la protéine murine.

Adapté de (O'Regan & Berman 2000).

Phosphorylation

La phosphorylation est la forme de MPTs de l'OPN la plus importante. Ce sont surtout des résidus sérine et thréonine qui sont phosphorylés. Les études de l'OPN osseux de rat ont permis d'identifier 12 phosphosérines et une phosphothréonine (Prince & Butler 1987), alors que l'OPN du lait bovin contient 27 phosphosérines et une phosphothréonine (Sorensen & coll. 1995). 26 de ces résidus phosphorylés sont situés dans un site consensus de phosphorylation par la caséine kinase des glandes mammaires (MGCK) (Ser/thr-X-Glu/(p)Ser), alors que les deux restants sont phosphorylés par la caséine kinase II (Ser-X-X-Glu/(p)Ser) (Katayama & coll. 1998). L'étude d'OPN sécrétée à partir de cellules ostéogéniques transformées a permis d'identifier plusieurs isoformes de l'OPN avec différents degrés de phosphorylation (Kasugai & coll. 1991; Safran & coll. 1998). Plus récemment Christensen & coll. ont identifiés sur l'OPN de lait humain 34 phosphosérines et deux phosphothréonines (Fig.5). 29 de ces résidus peuvent être phosphorylés par la MGCK (Ser⁸, Ser¹⁰, Ser¹¹, Ser⁴⁶, Ser⁴⁷, Ser⁶⁰, Ser⁶², Ser⁶⁵, Ser⁸³, Ser⁸⁶, Ser⁸⁹, Ser⁹², Ser¹⁰⁴, Ser¹¹⁰, Ser¹¹³, Ser¹⁷⁹, Ser²⁰⁸, Ser²¹⁸, Ser²³⁸, Ser²⁴⁷, Ser²⁵⁴, Ser²⁵⁹, Ser²⁶⁴, Ser²⁷⁵, Ser²⁸⁷, Ser²⁹² and Ser²⁹⁴, Thr⁵⁰ et Thr¹⁶⁹) et six résidus sérine par la caséine kinase II (Ser¹⁰¹, Ser¹⁰⁷, Ser¹⁷⁵, Ser¹⁹⁹, Ser²¹² and Ser²⁵¹). La dernière phosphosérine (Ser²⁰³) n'est reconnue par aucune des deux kinases (Christensen & coll. 2005). Il a été démontré que l'OPN pourrait être phosphorylée *in vitro* par d'autres kinases comme la PKC et la kinase dépendante du GMPc (Salih & coll. 1996).

Plusieurs évidences ont montré que la phosphorylation de l'OPN joue un rôle important dans la régulation de ses fonctions biologiques, toutefois le mécanisme par lequel

ces modifications changent cette fonction n'est pas encore élucidé. Par exemple l'OPN est connue pour son activité d'inhibition de la formation des molécules d'hydroxyapatite. Cette activité est perdue si l'OPN est déphosphorylée (Boskey & coll. 1993; Hunter & coll. 1994). D'un autre côté, il a été démontré que l'OPN recombinante (non phosphorylée) augmente la minéralisation des cellules vasculaires du muscle lisse, alors que l'OPN phosphorylée inhibe ce processus (Jono & coll. 2000).

La phosphorylation de l'OPN peut aussi être dépendante de la maturité de la cellule ou bien du type cellulaire. En effet Sodek & coll. ont montré que les ostéoblastes synthétisent l'OPN sous deux formes, une forme moins phosphorylée qui migre sur gel SDS-polyacrylamide à 55kDa et une autre forme plus phosphorylée qui migre à 44kDa (Sodek & coll. 1995). Il a été proposé que la forme à 55 kDa est majoritairement produite par des ostéoblastes moins différenciés, alors que la forme de 44kDa serait quant à elle produite par des cellules plus matures (Safran & coll. 1998). Christensen & coll. ont montré que les ostéoblastes de souris MC3T3 et les fibroblastes de souris transformés par la surexpression de l'oncogène Ras présentent différents degrés de phosphorylation de l'OPN (Christensen & coll. 2007).

La régulation de la phosphorylation de l'OPN s'effectue aussi par l'action des phosphatases, c'est l'équilibre entre l'action des kinases et des phosphatases qui déterminent le degré de phosphorylation de l'OPN. Plusieurs études ont démontré que les phosphatases acides (telles que la phosphatase acide de la prostate (PrAP) et la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP)) sont les plus efficaces pour déphosphoryler l'OPN (Ek-Rylander & coll. 1994; Ek-Rylander & coll. 1997; Andersson & coll. 2003).

Glycosylation

L'OPN a été caractérisée au début comme une glycoprotéine riche en acide sialique (d'où le nom de sialoprotéine osseuse I). La glycosylation de l'OPN est estimée à 33% du poids de la protéine (Oldberg & coll. 1986) et celle-ci se produit dans la majorité des tissus. Prince & coll. ont analysé l'OPN d'os de rat et ont montré qu'elle contient 30 monosaccharides dont 10 acides sialiques (Prince & coll. 1987). Ces modifications peuvent être des N-glycosylations ou bien des O-glycosylations. En effet, la séquence de l'OPN de bœuf contient 26 sites d'O-glycosylation (Ser-X-Glu) et un seul site de N-glycosylation (Asn-X-Ser). Toutefois, Sorensen & coll. n'ont identifié que trois sites O-glycosylés dans l'OPN de lait de bœuf (Sorensen & coll. 1995), alors que dans l'OPN osseuse de bœuf, six sites de O-glycosylation et un seul site de N-glycosylation ont été identifiés (Prince & coll. 1987). Christensen de son côté a identifié sur la séquence de l'OPN humaine cinq résidus thréonine pouvant être O-glycosylés et deux qui peuvent être N-glycosylés (Fig.5, (Christensen & coll. 2005))

Transglutamination

Les transglutaminases tissulaires sont une famille d'enzymes calcium dépendante qui catalysent la formation de liaisons covalentes entre un groupe amine d'une lysine et le groupe gamma-carboxyamide d'une glutamine. Cette réaction a pour effet de stabiliser les liaisons d'OPN avec d'autres protéines et facilite la polymérisation des molécules d'OPN qui peuvent former un complexe moléculaire de plus de 4000kDa (Sorensen & Petersen 1995). Deux glutamines (Gln34 et Gln36) situées dans la séquence N-terminal ont été identifiées comme étant les cibles des transglutaminases (Sorensen & coll. 1994; Christensen & coll. 2005). La transglutamination permet à l'OPN de se lier à certaines

composantes de la matrice extracellulaire afin de promouvoir l'initiation et la régulation de la minéralisation, parmi ces composantes on retrouve la fibronectine (Beninati & coll. 1994) et le collagène (Kaartinen & coll. 1999). Prince & coll. ont proposé que la transglutamination permet aux cellules cancéreuses de s'attacher à l'OPN dans des sites secondaires et ainsi former des métastases (Prince & coll. 1991).

Récepteurs de l'OPN

Intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires dimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Humphries 2000). Jusqu'à présent, plus de 22 hétérodimères ont été identifiés, chacun ayant la capacité de reconnaître une ou plusieurs séquences d'acides aminés spécifiques. Certaines intégrines sont impliquées dans des interactions cellule-cellule, ou bien dans l'adhésion des cellules à la matrice-extracellulaire (Elangbam & coll. 1997). La liaison de l'intégrine à son ligand induit un changement conformationnel de son domaine cytoplasmique, qui recrute alors un ensemble de molécules permettant l'activation des voies de signalisation intracellulaire spécifiques qui peuvent avoir des effets importants sur la survie et la prolifération de la cellule (Guo & Giancotti 2004).

L'interaction de l'OPN aux intégrines est bien caractérisée. Cette interaction se fait principalement via la séquence GRGDS de l'OPN pour les isoformes $\alpha_v\beta_3$, l'intégrine qui possède la plus grande affinité pour l'OPN (Ross & coll. 1993; Liaw & coll. 1995), $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$ (Hu & coll. 1995) $\alpha_8\beta_1$ (Denda & coll. 1998) et $\alpha_5\beta_1$ (Liaw & coll. 1995). D'autres évidences ont montré que l'OPN peut se lier aux intégrines de façon RGD indépendante,

notamment la liaison de $\alpha_9\beta_1$ et de $\alpha_4\beta_1$ à l'OPN via une séquence cryptique (SVVYGLR) qui devient accessible après le clivage de l'OPN par la thrombine (Smith & coll. 1996).

La liaison de l'OPN aux différents dimères d'intégrines pourrait expliquer la multitude des fonctions et des voies de signalisation que peut activer l'OPN. Parmi ces fonctions, on trouve l'attachement cellulaire, la migration des cellules, leur survie, le chimiotactisme et une signalisation intracellulaire dans différentes cellules. Par exemple Liaw & coll. ont montré que l'interaction de l'OPN immobilisée avec les intégrines $\alpha_v\beta_{1,3,5}$ induit l'adhésion des cellules musculaires lisses alors qu'en utilisant le même système, seulement $\alpha_v\beta_3$ est capable de promouvoir la migration de ces cellules et la modulation du calcium intracellulaire (Miyauchi & coll. 1991). En utilisant un autre modèle cellulaire soit les cellules endothéliales d'aorte de rat, Scatena & coll. ont montré que l'interaction OPN- $\alpha_v\beta_3$ prévient l'apoptose de ces cellules via l'activation de NF κ B dépendante de Src et de Ras (Scatena & coll. 1998).

CD44

CD44 est le principal récepteur cellulaire de surface de l'acide hyaluronique qui, après liaison à son ligand, stimule la motilité cellulaire et l'agrégation. Cependant, il a été montré que CD44 peut aussi lier les composantes de la matrice extracellulaire incluant l'OPN (Weber & coll. 1996). La famille des récepteurs CD44 induit des réponses cellulaires similaires à celles des intégrines incluant l'adhésion et la migration cellulaire. En effet, il a été montré que certains isoformes de CD44 coopèrent avec les intégrines contenant la sous-unité β_1 pour se fixer sur des domaines multiples de l'OPN afin de stimuler la mobilité cellulaire et le chimiotactisme (Katagiri & coll. 1999). La structure et

les fonctions biologiques de CD44 seront expliquées plus en détail dans la section intitulée CD44.

Rôles physiologiques de l'OPN

L'OPN est exprimée dans une multitude de tissus et est sécrétée dans plusieurs liquides biologiques ce qui justifie son implication dans une multitude de processus biologiques. L'OPN ne possède pas de rôle majeur au cours du développement vu que les souris OPN^{-/-} sont viables et ne présentent aucun phénotype majeur (Rittling & Denhardt 1999). Cependant l'analyse plus poussée de ces souris a permis de mieux comprendre son rôle dans différents systèmes biologiques ainsi que sa contribution à différentes pathologies (Rittling & Denhardt 1999).

Rôle de l'OPN dans l'os :

L'OPN est fortement exprimée dans l'os et les dents. C'est la protéine non-collagénique la plus abondante de la matrice osseuse. D'ailleurs, l'OPN est considérée comme un marqueur de différenciation des ostéoblastes (McKee & Nanci 1995). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'OPN exerce son action au niveau de l'os à travers trois fonctions. Premièrement, l'OPN agit comme molécule d'adhésion des ostéoblastes et des ostéoclastes à la matrice extracellulaire à travers sa séquence de liaison aux cristaux d'hydroxyapatite, soit la séquence poly-acide aspartique ainsi que via sa liaison aux intégrines médiée par la séquence RGD. Deuxièmement, l'OPN est essentielle pour l'activité des ostéoclastes. Cette régulation s'effectue via l'interaction de l'OPN avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et permet aux ostéoclastes de reconnaître les sites de résorption, de migrer le long de l'os à résorber ainsi que d'activer la voie de signalisation en aval des intégrines

nécessaire à la stimulation de l'activité des ostéoclastes (Denhardt & Noda 1998; Rittling & coll. 1998; Chellaiah & Hruska 2003).

Les souris $OPN^{-/-}$ ont des os plus résistants et plus minéralisés que les souris sauvages dû à une diminution de la résorption osseuse (Boskey & coll. 2002). L'absence d'OPN protège ces souris contre l'ostéoporose induite suite à l'ovariectomie (Yoshitake & coll. 1999). De plus, l'hormone parathyroïde (PTH) est incapable d'induire l'augmentation de la résorption osseuse chez les souris $OPN^{-/-}$ contrairement aux souris sauvages (Ihara & coll. 2001).

L'OPN joue aussi un rôle important comme mécanotransducteur. En effet, Ishijima & coll. ont montré que l'OPN est requise pour induire la diminution de la densité osseuse dans les expériences de suspension de la queue de rat qui simulent la perte de la contraction mécanique sur les os (Ishijima & coll. 2002). De plus, il a été montré que l'OPN est surexprimée dans les ostéoblastes subissant un stress mécanique suggérant ainsi son rôle comme mécanorécepteur (Ichikawa & coll. 2000). Le stress mécanique est connu pour son rôle dans la régulation du remodelage osseux (Burger & Klein-Nulen 1999). En effet, plusieurs évidences suggèrent que les ostéoblastes forment l'os jusqu'à réception d'un signal induit par un stress mécanique, par contre les ostéoclastes résorbent l'os jusqu'à ce qu'un niveau physiologique de stress mécanique soit atteint (Marcus 1996; Burger & Klein-Nulen 1999). L'OPN, étant un régulateur à la fois de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes, elle pourrait agir comme mécano-transducteur permettant de traduire le stress mécanique en signaux physiques favorisant l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire (You & coll. 2000) ou bien en signaux biologiques en activant la voie de signalisation en aval des intégrines (Salter & coll. 1997).

Système urinaire

La forme urinaire de l'OPN s'appelle uropontine (UPN). Elle est sécrétée par les cellules épithéliales de l'anse de Henlé, du tube contourné distal ainsi que de l'épithélium vésical prostatique et épидидymaire (Brown & coll. 1992). Shiraga & coll. ont montré que l'UPN est un inhibiteur de la formation des cristaux d'oxalate de calcium (Shiraga & coll. 1992). Par contre, d'autres chercheurs ont présenté des évidences que l'UPN facilite l'attachement des cristaux d'oxalate de calcium sur les cellules rénales (Yasui & coll. 2002). Cette controverse peut être expliquée par le fait que la forme phosphorylée de l'OPN a une activité inhibitrice plus grande comparativement à la forme non phosphorylée (Hoyer & coll. 2001; Wang & coll. 2008). L'OPN en solution peut libérer les ions de calcium et ainsi inhiber la cristallisation alors que l'OPN immobilisée sur une surface lie le calcium et augmente l'adhésion ainsi que l'agrégation des cristaux (Kleinman & coll. 2004).

Système immunitaire

L'OPN est sécrétée par plusieurs cellules immunitaires, comme les macrophages, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK. Cette sécrétion est augmentée en cas de pathologies immunitaires ou infectieuses. La sécrétion de l'OPN permet l'attraction des macrophages et des cellules T aux sites d'inflammation ou d'infection (Giachelli & coll. 1998). L'OPN peut aussi se lier aux leucocytes activés et aux macrophages afin de changer le profil de sécrétion des cytokines. En effet il a été montré que l'OPN active la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron γ ou l'interleukine 12 (O'Regan & coll. 2000), et inhibe la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'interleukine-10 (Ashkar & coll. 2000). L'utilisation d'anticorps interférant avec la liaison

de l'OPN à ses récepteurs a permis de montrer que l'activation de l'interleukine 12 nécessite sa liaison au récepteur $\alpha_v\beta_3$, par contre l'inhibition de l'interleukine 10 passe via le récepteur CD44 (Ashkar & coll. 2000). Ces deux processus dépendent de l'état de phosphorylation de l'OPN (Weber & coll. 2002).

Cancer

Senger & coll. ont identifié l'OPN comme étant une protéine sécrétée par les cellules transformées (Senger & coll. 1979). Depuis, il a été montré que l'OPN est impliquée dans plusieurs types de cancers. L'augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'OPN sont corrélées avec l'invasion et la progression tumorale ainsi qu'une grande probabilité de métastases (Furger & coll. 2001; Wai & Kuo 2008). Par contre l'inhibition de l'expression de l'OPN dans des cellules transformées diminue le pouvoir tumorigénique et métastatique de ces cellules (Feng & coll. 1995). Cette caractéristique a poussé plusieurs chercheurs à essayer de traiter certains types de cancers en inhibant l'expression de l'OPN (Wai & coll. 2005; Ito & coll. 2006; Shevde & coll. 2006; Chakraborty & coll. 2008; Gong & coll. 2008). Paradoxalement Morimoto & coll. ont montré que l'OPN inhibe la transformation cancéreuse. Ils ont montré que l'OPN est la cible du gène suppresseur de tumeur TP53 et que la stimulation de l'expression du gène de l'OPN par TP53 empêcherait les cellules ayant un ADN endommagé d'entrer dans un cycle de transformation cancéreuse (Morimoto & coll. 2002).

Autres rôles physiologiques de l'OPN

Vu l'implication de l'OPN dans une multitude de processus biologiques et pathologiques, il est difficile de citer toutes ses fonctions. Ci-dessous une liste non exhaustive des autres fonctions biologiques de l'OPN (Tableau 2).

Tableau 3 : Liste des autres rôles potentiels de l'OPN

Système	Rôle de l'OPN	Référence
Vasculature	Inhibiteur de la calcification	Isoda & coll. 2002
	Stimule l'angiogenèse	Takahashi & coll. 2002
Système cardiaque	Participe à la reconstruction du ventricule gauche en induisant la sécrétion du collagène	Trueblood & coll. 2001
Guérison des plaies	Stimule l'agrégation plaquettaire	Bennett & coll. 1997
	augmente l'attachement et l'intégration des cellules	Senger & coll. 1996
Cerveau	Protège contre la démyélinisation	Chabas & coll. 2001
	Son expression est augmentée dans les cerveaux de patients atteints du syndrome de Huntington ou d'épilepsie	Karpuj & coll. 2002 Kim & coll. 2002

CD44

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire identifiée initialement comme antigène de surface des cellules T interagissant avec un anticorps monoclonal F10-44-2 (Dalchau & coll. 1980). D'autres équipes ont isolé la protéine dans différents types cellulaires d'où l'existence de plusieurs autres appellations selon la fonction ou la structure de CD44, ce qui explique la multiplicité de ses rôles physiologiques. Parmi les appellations on retrouve : récepteur de l'acide hyaluronique (ou hyaluronane), pg90^{Hermes}, récepteur de la matrice extracellulaire III (ECMRIII), glycoprotéine 85 (gp-85), Ly-24, molécule d'adhésion cellulaire du homing (H-CAM), glycoprotéine de phagocytose (pgp-1) (Naor & coll. 1997).

Structure du gène codant pour CD44

Le CD44 est codé par un gène présent en une seule copie et localisé dans le bras court du chromosome 11 humain (Goodfellow & coll. 1982) et le chromosome 2 de la souris (Colombatti & coll. 1982). Ce gène qui s'étale sur environ 50kb contient 20 exons dont 10 (désignés variable ou 'v') qui subissent un épissage alternatif donnant naissance à différentes isoformes (Fig.7) (Haegel-Kronenberger & coll. 1997). Les premiers cinq exons codent pour le domaine extracellulaire qui peut être allongé par inclusion d'exons variables (exon 6-15). Les exons 16 et 17 codent pour la région membranaire proximale, suivie d'une séquence hydrophobe transmembranaire codée par l'exon 18. Finalement les exons 19 et 20 codent pour le domaine cytoplasmique, ces deux exons peuvent aussi subir un épissage alternatif donnant naissance soit à la forme longue ou la forme courte de la queue cytoplasmique de CD44 (Naor & coll. 1997).

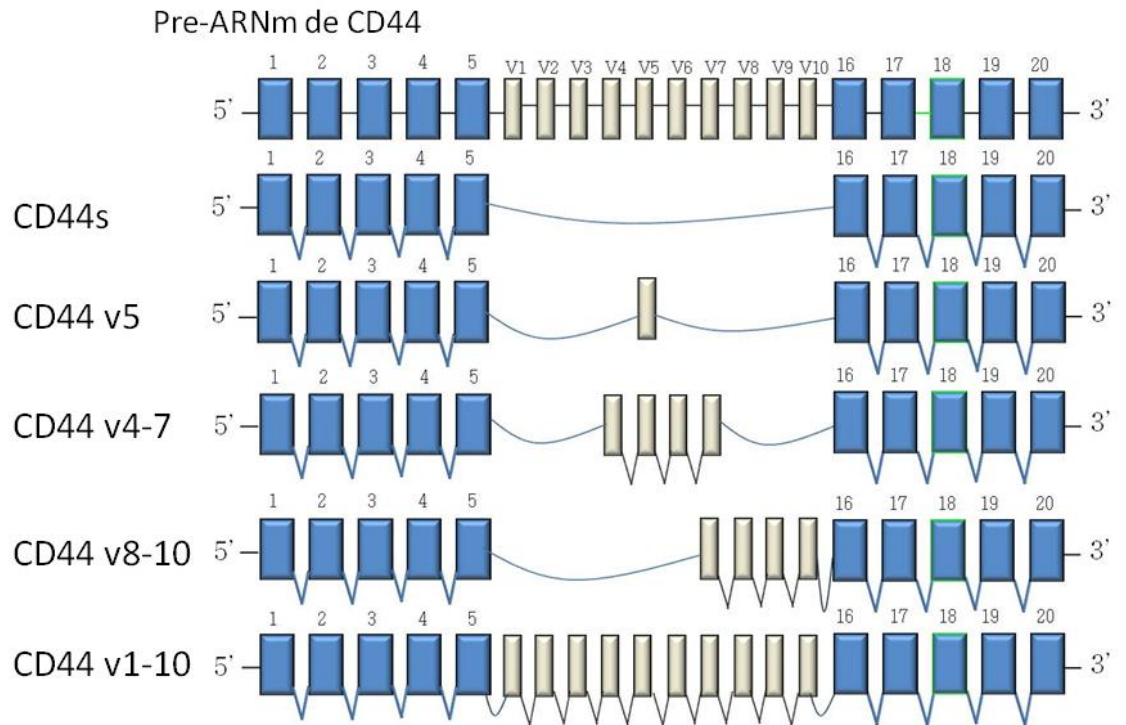


Figure 7. Représentation schématique de la structure du gène de CD44 et de certaines isoformes produites par épissage alternatif. Adapté de (Ponta & coll. 2003).

L'isoforme la plus courte, dite standard (CD44s), ne contient aucun exon variable et est exprimée de façon ubiquitaire, alors que l'expression des différents isoformes varie d'un tissu à un autre. Par exemple, l'isoforme la plus longue (CD44v1-10) n'est exprimée que dans certaines cellules épithéliales en prolifération ou bien dans certains cancers (Mackay & coll. 1994).

Structure de la protéine CD44

Le CD44 est une protéine transmembranaire contenant trois domaines, un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

Domaine extracellulaire : Ce domaine globulaire englobe un motif capable de fonctionner comme un site d'ancrage de plusieurs composantes de la matrice extracellulaire, notamment le collagène, la fibronectine et le hyaluronan (HA). Ce dernier est le principal ligand de CD44. C'est un polymère de disaccharides (D-glucuronique et D-N-acétylglucosamine), pouvant avoir une taille allant jusqu'à 10,000 kDa (Laurent & Fraser 1992). Plusieurs études ont démontré, par des approches différentes, la liaison de CD44 au HA avec une affinité plus grande pour les molécules de HA de haut poids moléculaire (Underhill & coll. 1983; Naor & coll. 1997). Cette affinité varie d'une isoforme à une autre vu que la taille du domaine extracellulaire varie selon la taille et le nombre d'exons inclus par épissage alternatif (Jackson & coll. 1995). Il a été démontré que plusieurs isoformes ont une affinité diminuée pour le HA par rapport à l'isoforme standard, telles que CD44v6-10, CD44v7-10, CD44v3 et 8-10 (Naor & coll. 1997).

L'affinité de CD44 au HA peut aussi être modulée par les modifications posttraductionnelles que peut subir le domaine extracellulaire de CD44, notamment des O- et N-glycosylations (Bartolazzi & coll. 1996). En effet, chez l'humain six sites potentiels de N-glycosylation et sept sites de O-glycosylation ont été identifiés (Goldstein & coll. 1989), tandis que chez la souris il y en a cinq et dix respectivement (Zhou & coll. 1989). Une autre modification est la liaison de glycosaminoglycanes (GAGs,) comme l'héparane sulfate, le keratan sulfate et la chondroïtine sulfate (Stamenkovic & coll. 1989).

Le domaine extracellulaire est séparé du domaine transmembranaire par une courte séquence d'acides aminés (46 acides aminés) nommée «Stem structure» (**Fig. 7**). Cette séquence contient les sites potentiels de clivage du CD44 ainsi que le site d'insertion des différents exons inclus par épissage alternatif ce qui pourrait allonger la taille de cette séquence jusqu'à 341 acides aminés chez l'humain et 426 acides aminés chez la souris (Screaton & coll. 1992; Ponta & coll. 2003).

Domaine transmembranaire : ce domaine est constitué de 23 acides aminés hydrophobes. Ces acides aminés sont tous conservés entre l'homme et la souris (Zhou & coll. 1989). Cette région est riche en résidus cystéine qui sont importants pour la fonction de la protéine vu leur capacité à former des ponts disulfides induisant l'oligomérisation des molécules de CD44 ainsi que leur liaison au domaine lipidique de type Rafts (Neame & coll. 1995; Liu & Sy 1996).

Domaine cytoplasmique : ce domaine est très conservé et présente 80 à 90% d'homologie entre les espèces étudiées à ce jour (Stamenkovic & coll. 1989; Screaton & coll. 1992). Il contient les motifs importants pour son interaction avec d'autres protéines

indispensables à sa fonction ainsi qu'à sa localisation subcellulaire. Le premier partenaire intracellulaire de CD44 à être isolé est l'ankyrine, protéine à travers laquelle CD44 interagit avec le cytosquelette (Kalomiris & Bourguignon 1988). Cette interaction peut aussi être médiée par d'autres protéines de la famille des ERM (Ezrine, Radixine, Moésine) qui sont des protéines de liaison au cytosquelette impliquées dans la redistribution des molécules d'adhésion et l'organisation de la structure de la membrane cellulaire (Tsukita & coll. 1994).

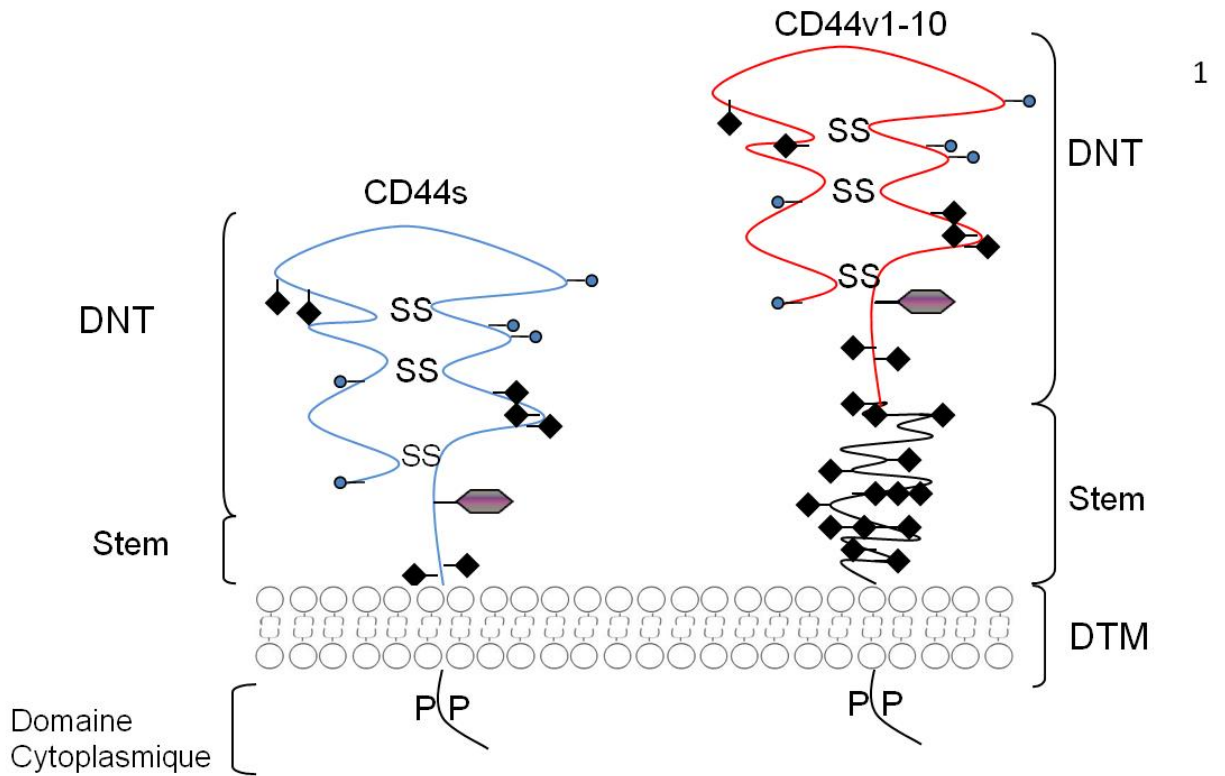


Figure 8. Structure protéique du CD44s comparée à l'isoforme la plus longue (CD44v1-v10). Cette figure montre les différents domaines de CD44, le domaine N-terminal ou extracellulaire (DNT), la structure en tige (Stem), le domaine transmembranaire (DTM) et le domaine cytoplasmique. Adapté de (Ponta & coll. 2003).

Des expériences de délétion et de mutagenèse ont démontré que le domaine cytoplasmique joue un rôle important dans la régulation de la liaison de CD44 à son ligand HA (Lesley & coll. 1992). Cette région de CD44 humain et de souris contient respectivement six et dix sites potentiels de phosphorylation (Kalomiris & Bourguignon 1989). Il a été démontré que la phosphorylation de ce domaine augmente l'affinité de CD44 à l'ankyrine (Kalomiris & Bourguignon 1988). D'un autre côté Neame et Isacke ont montré que la localisation subcellulaire de CD44 dépendait de la phosphorylation des résidus Ser³⁰³ et Ser³⁰⁵ (Neame & Isacke 1992).

CD44 soluble : le CD44 soluble (sCD44) est généré principalement par le clivage du domaine extracellulaire de la protéine (Cichy & coll. 2002). Il a été montré que le sCD44 peut aussi être produit *de novo* par la synthèse d'une protéine dépourvue de ses domaines transmembranaire et cytoplasmique (Yu & Toole 1996). Les isoformes de CD44 incluant des exons variables sont plus enclins à être clivées que l'isoforme standard (Bartolazzi & coll. 1995). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a permis de démontrer que les métalloprotéinases endogènes ainsi que les sérines protéases sont impliquées dans le clivage de CD44, notamment les membres de la famille ADAM, les métalloprotéinases de type 1 (MT1-MMP) et de type 3 (MT3-MMP) (Okamoto & coll. 1999; Kajita & coll. 2001; Shi & coll. 2001).

Le sCD44 est sécrété dans plusieurs liquides biologiques comme le sérum, la lymphe et le liquide synoviale (Katoh & coll. 1994). Les concentrations sériques du sCD44 varient selon l'espèce ainsi que d'une pathologie à l'autre (Katoh & coll. 1994). Ces taux

diminuent chez les patients atteints d'immunodéficience ou bien de maladies auto-immunes (Schlosser & coll. 2001) et sont nettement plus élevés chez les patients atteints de cancers (Molica & coll. 2001). Cette augmentation a suscité l'intérêt des chercheurs à investiguer son utilisation potentielle comme biomarqueur de la croissance des tumeurs et leur métastase et plus particulièrement les isoformes sCD44v5 et sCD44v6 (Cichy & Pure 2003).

Le rôle physiologique du sCD44 est attribué à sa capacité de compétitionner avec le CD44 de surface pour la liaison de ses ligands. Il a été démontré que sCD44 inhibe la liaison du HA au CD44 de surface, cette inhibition dépend de l'affinité du sCD44 à lier le HA (Kato & coll. 1994; Peterson & coll. 2000). Il a été aussi suggéré que le clivage de CD44 pourrait être utilisé pour interrompre les liens formés par le CD44 entre les cellules ou bien entre les cellules et la matrice extracellulaire et ainsi favoriser la migration de ces cellules (Cichy & Pure 2003).

Fonctions biologiques de CD44

Les fonctions du CD44 sont attribuées principalement à son rôle comme molécule d'adhésion et sa liaison au HA. La découverte de ces fonctions a été réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps capables d'interférer avec la liaison de ses ligands, à la surexpression d'oligonucléotides capables d'inhiber son expression ainsi qu'à l'étude de souris déficientes en CD44. Ces souris sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype apparent, à l'exception d'une légère anomalie de la migration des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques périphériques et le thymus (Schmits & coll. 1997; Protin &

coll. 1999). Ceci était inattendu vu la multitude des fonctions dans lesquelles CD44 est impliqué.

La première fonction de CD44 à être décrite est son rôle dans l'adressage ``homing`` et la migration des lymphocytes. Il a été démontré que l'injection d'anticorps anti-CD44 bloque la liaison des lymphocytes à la Veinule à endothélium haut (high endothelial venules), veinule qui est considérée comme étant la principale porte d'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Woodruff & coll. 1987). La déplétion des cellules CD44⁺ de la moelle osseuse en utilisant un anticorps anti-CD44 inhibe leur capacité à reconstituer le thymus de souris irradiées (O'Neill 1989). Vu le grand nombre de fonctions biologiques de CD44, celles-ci seront résumées dans le tableau 3.

Tableau 4 : Fonctions de CD44, adapté de Ponta & coll. 2003

Phenotype	Approche expérimentale	Fonction de CD44	Référence
Direction des axones dans le chiasma optique	Interférence avec un anticorps pan anti-CD44	CD44 de surface comme inhibiteur de la croissance des axon dans une direction donnée	Ries & coll. 2007
Développement de la prostate et du bourgeon de l'urètre	Interférence avec un anticorps pan anti-CD44	Rôle dans la morphogenèse des branches	Alam & coll. 2004
Lymphogenèse dans le foie fœtal	Interférence avec un anticorps anti-variant CD44	Différenciation des cellules T	Davern & coll. 2002
Développement des bourgeons des membres	Interférence avec un anticorps anti-variant CD44	Adhésion et migration	Rousche & Knudson 2002
Inflammation	Interférence avec un anticorps pan anti-CD44	Stimulation de la signalisation des cytokines	Pure & Cuff 2001
Arthrite rhumatoïde auto-immune	Crosslinking avec un anticorps pan anti-CD44	Induit la surexpression de Fas	Naor & Nedvetzki 2003
Colites auto-immune	Interférence avec un anticorps anti-variant CD44, souris CD44 ^{-/-}	Stimulation de la signalisation des cytokines	Wittig & coll. 2000
Remodelage de tissus	souris CD44 ^{-/-} (exon 4 et 5)	Récepteur de signalisation	Yu & coll. 2002

Résultats

Étude de la voie de signalisation de la mélatonine à l'aide de la spectrométrie cellulaire diélectrique

Introduction

Le défaut de la signalisation de la mélatonine a été identifié en utilisant une technique simple mais qui est relativement lourde à réaliser puisque le protocole nécessite presque une journée complète avec plusieurs heures de travail dans la chambre froide, d'où la complexité à l'utiliser de façon routinière pour tester des patients. Nous avons pris avantage de l'avènement d'une nouvelle technique qu'est la spectroscopie cellulaire diélectrique présentée comme un outil incontournable pour étudier la fonctionnalité des récepteurs couplés aux protéine G. Cette technique ne nécessite pas de marquage préalable du récepteur ou du ligand et peut être utilisée pour analyser des récepteurs endogènes ou transfectés. Le fait qu'elle soit automatisée procure des résultats plus précis et reproductibles. Cependant, l'analyse des cellules par cette technique doit être effectuée par le CellKeyTM, appareil dont l'utilisation est très limitée présentement vu le coût relativement élevé pour qu'il soit utilisé par plusieurs laboratoires académiques.

Deuxième publication: Cell-based screening test for idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy.

Article soumis au journal Spine juillet 2009.

Ma participation dans cet article :

Dans cet article, je me suis occupé des cultures cellulaires, des tests d'AMPc. J'ai participé aussi à l'analyse des données, à la rédaction de la première version de cet article et à la conception des figures.

Cell-based screening test for idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy

Marie-Yvonne Akoume^{1,3} Ph.D., **Bouziane Azeddine**¹ M.Sc., Isabelle Turgeon¹ B.Sc., Anita Franco¹ M.Sc., Hubert Labelle^{4,5} M.D., Benoît Poitras⁵ M.D., Charles-Hilaire Rivard⁵ M.D., Guy Grimard⁵ M.D., Jean Ouellet⁶ M.D., Stefan Parent⁵ M.D., Ph.D. and Alain Moreau^{1,2,3,*} Ph.D.

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Qc, Canada;

²Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal

³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal

⁴LIS3D Laboratory, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal;

⁵Orthopedic Division, Sainte-Justine University Hospital and Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal

⁶Orthopedic Division, The Montreal Children's Hospital, Department of Surgery, McGill University, Montreal

*Corresponding author: Prof. Alain Moreau, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Director of Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases (room 4734), 3175 Cote-Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Phone: 514-345-4931 ext 3476; Fax: 514-345-4801

This work was supported by grants from La Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France, Paris, France (to Dr. Moreau and Dr. Labelle) and from Paradigm Spine LLC, New York, USA (to Dr. Moreau).

The institutional review boards of The Sainte-Justine University Hospital, The Montreal Children's Hospital, The Shriners Hospital for Children in Montreal and McGill University approved the study.

Structured Abstract

Study design: A cell-based assay was developed to identify asymptomatic children at-risk of developing Idiopathic Scoliosis (IS) and to stratify IS patients at an earlier stage in order to better predict their clinical outcome. Clinical validation of this assay was performed by testing IS patients at different stages, healthy control subjects and asymptomatic offspring, born from at least one scoliotic parent, who are considered at-risk of developing this disorder.

Objective: Our goal was to develop and validate a clinical test for IS using cellular dielectric spectroscopy (CDS) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Summary of Background Data: We have previously demonstrated the occurrence of a melatonin signaling dysfunction in osteoblasts obtained from severely affected IS patients using a cAMP assay. This led us to stratify IS patients into three functional subgroups.

Methods: A group of 44 patients with IS was compared to 42 healthy control subjects and 31 asymptomatic at-risk children. PBMCs were obtained after centrifugation on a Ficoll-gradient. Melatonin signal transduction was measured by CDS in the presence of varying concentrations of melatonin or iodomelatonin.

Results: Osteoblasts from distinct functional subgroups were re-tested using CDS, allowing their classification into the same functional subgroups with both ligands as initially demonstrated using a cAMP assay. Clinical data obtained with CDS and PBMCs showed 100% specificity and 100% sensitivity since melatonin signaling impairment was observed only in IS patients and not in healthy controls. Assessment of the risk of developing a scoliosis in asymptomatic children was determined by CDS in 33% of asymptomatic children at-risk, which was confirmed clinically several months later.

Conclusion: This cell-based assay can serve as a presymptomatic screening test to identify asymptomatic children at-risk of developing IS and may be used to improve stratification of patients, which in turn allow clinicians to predict their clinical outcome. Moreover, this functional blood test is advantageous because it can be performed without prior knowledge of specifically mutated genes causing IS.

Key Points

- This study presents the first experimental evidence that melatonin signaling defects also occur in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from IS patients.
- Comparison of melatonin response between osteoblasts and PBMCs obtained from the same set of IS patients using cellular dielectric spectroscopy showed a similar melatonin signaling defect, allowing their classification into three functional subgroups.
- This functional blood test can identify asymptomatic children who are at-risk of developing scoliosis as well as stratify IS patients in order to better predict their clinical outcome.

Mini Abstract

A cell-based assay was performed to assess melatonin signal transduction in peripheral blood mononuclear cells obtained from patients with IS and asymptomatic children using cellular dielectric spectroscopy. This functional blood test allowed the stratification of IS patients into three functional subgroups. Similar analysis with asymptomatic children led to the identification of individuals at-risk of developing scoliosis before onset.

Introduction

Spinal deformities and scoliosis in particular, represent the most prevalent type of orthopedic deformities in children and adolescents, while idiopathic scoliosis (IS) represents the most common form of scoliosis. Unfortunately, there is no proven method to identify children or adolescents at risk of developing IS, and no test is approved as of yet by the FDA to predict which affected individuals require treatment to prevent or stop progression of the disease.¹ Consequently, the application of current treatments, such as bracing or surgical correction, is delayed until the detection of a significant deformity or a demonstration of clear progression, resulting in a delayed and less-than-optimal treatment.² Among patients with IS requiring treatment, 80 to 90% will be treated by bracing and around 1% will need surgery to correct the deformity by spinal instrumentation and fusion of the thoracic and/or lumbar spine with the risk of having complications.³ Today in the United States there are approximately one million children between ages 10 and 16 with some degree of IS. One out of every six children diagnosed with scoliosis will have a curve that progresses to a degree that requires active treatment. About 29,000 scoliosis surgeries are done every year in North America, resulting in significant psychological and physical morbidity.^{4;5}

The efforts for developing approaches that could offer a better outcome for patients with IS or allow specific prevention among the asymptomatic pediatric population are largely hampered by our limited knowledge of the etiology of this disease.⁶ Nevertheless, we previously reported a melatonin signaling dysfunction in patients with IS exhibiting severe scoliotic deformities, and suggested that evaluating this defect can serve as a

diagnostic procedure.^{7,8} Indeed, we found that primary osteoblast cultures prepared from bone specimens obtained intraoperatively during spinal surgeries of these patients exhibited different degrees of inability to inhibit forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in response to melatonin, which allowed classification of patients with IS into three functional subgroups. This was done using the classical evaluation of cAMP production, which can suffer from marginal precision. In order to overcome this limitation and develop a more sensitive clinical screening test, we have adopted a new method called cellular dielectric spectroscopy (CDS) using a new apparatus CellKeyTM (MDS Analytical Technologies, CA, USA). This label-free system offers a direct measure of functional activity of G proteins in multiple cell types.^{9,10} The use of osteoblasts for a routinely clinical test is unrealistic due to a number of limitations, including the difficulty of obtaining bone specimens and the necessity of culturing cells to adequate confluence prior to performing the test. Therefore, there is a need to develop a more convenient and accessible prognostic alternative. A method that utilizes peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples would be highly desirable, as it would allow clinical samples to be obtained easily using minimally invasive procedures. The rationale for using blood cells to determine the functional status of melatonin signaling is based on the fact that melatonin receptors are normally present in many tissues, including blood cells such as lymphocytes.¹¹ These cells make up about 20% to 40% of the white blood cells present in circulation and are considered a convenient probe of cellular functions.¹² We tested the possibility that lymphocytes from scoliotic patients or asymptomatic children at-risk of developing this disease may show signs of melatonin signaling failure and then validated the use of this cell-based assay as a presymptomatic screening test in pediatric populations as a mean of better stratifying IS patients for prognostic purposes.

Methods

Study populations

The institutional review boards of The Sainte-Justine Hospital, The Montreal Children's Hospital, The Shriners Hospital for Children in Montreal and McGill University approved this study. Parents or legal guardians of all participants gave written informed consent, and minors gave their assent. All patients with IS were examined by one of the six orthopedic surgeons (H.L., B.P., C-H.R., G.G., J.O., S.P.) participating in this study. A person was deemed to be affected if history and physical examination were consistent with the diagnosis of IS and a minimum of a ten degree curvature in the coronal plane with vertebral rotation was found by radiograph. Demographics and clinical characteristics are shown in Table 1.

A number of young asymptomatic children born from one parent affected by IS were also enrolled in the study to evaluate the performance of the test in the asymptomatic population. Each subject was examined by the same orthopedic surgeon (B.P.) in our special clinic for early detection of IS at Sainte-Justine University Hospital. Demographics characteristics are shown in Table 2.

Healthy children were recruited as controls in Montreal's elementary schools after an informed written consent was obtained from their parents or legal guardians; minors also gave their assent. This recruitment was approved by The Montreal English School Board, The Affluent School Board and all institutional review boards mentioned above. Each normal subject was also examined by the same orthopedic surgeon (B.P.) using Adam's

forward bending-test with a scoliometer to rule out any hidden scoliosis before entering the study. Demographics characteristics are shown in Table 3.

Peripheral blood mononuclear cells preparation

Blood samples obtained from patients and control groups were collected in blood collection tubes containing EDTA and then centrifuged on a Ficoll-Plaque (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) solution to obtain PBMCs. PBMC fractions were preserved frozen in FBS with 10% DMSO and kept in liquid nitrogen until thawed and assayed.

Cellular dielectric spectroscopy (CDS)

CDS analyses were performed using a CellKey™ apparatus (MDS Sciex, San Francisco, CA, USA) which integrates a proprietary impedance measurement system. Small voltage at 24 frequencies, from 1 KHz to 10 MHz, are applied to a monolayer of cells settled in a 96-well microplate containing electrodes at the bottom, and the resultant current is measured at an update rate of 2 s. The system is thermally regulated and experiments were conducted at 28°C.

CDS assay with human osteoblasts

Bone specimens were obtained intraoperatively from vertebrae (varying from T3 to L4 according to the surgical procedure performed), while with trauma cases used as non-scoliotic controls bone specimens were obtained from other anatomical sites (tibia or femur, and in one case from an iliac crest biopsy). Osteoblasts were prepared as previously described⁷. Osteoblasts were seeded into the CellKey™ standard 96-well microplate at a density of 5×10^4 cells per well and incubated in standard conditions (37°C / 5% CO₂). In

some plates, Pertussis toxin (100ng/mL, Sigma, Oakville, ON, Canada) treatment was performed 16h before the CDS assay. Following overnight incubation, the plate was placed onto the CellKey™ system and growth medium was exchanged for assay buffer (Hanks, Balanced Salt Solution containing 20 mM HEPES and 0.1 % BSA) before starting the experiment. Cells were then allowed to equilibrate at room temperature for 30 min. At the end of this period, the plate was placed onto the system and pre-addition measurements were made for 5 min to obtain a baseline reading. Then, ligands (melatonin or iodomelatonin, Sigma) were added simultaneously to all 96 wells using an integrated fluidics system. Activation of endogenous receptors resulted in a change in impedance that started occurring immediately after fluid addition and mixing. Impedance measurements were collected for 15 min at 28°C.

CDS assay with PBMCs

PBMCs were harvested from stock tissue culture flask and washed three times with assay buffer. Typically, an average of 1.5×10^5 cells per well were seeded into the CellKey™ small 96-well microplate and allowed to settle for 30 min at room temperature. This resulted in a single layer of cells on top of the electrodes. After the cells settled, the microplate was placed on the instrument and receptor activation experiments were initiated in the manner described above after the acquisition of 5 min of baseline measurements.

cAMP assay in osteoblasts

Osteoblasts from patients with IS and control subjects were seeded in quadruplicate on 24-well plates (1×10^5 cells per well) and tested as previously described⁷. All assays were performed in duplicate.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SE. Multiple comparisons of means were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc test of Dunnett, using GraphPad Prism 4.0 software. Only P values < 0.05 were considered significant.

Results

Study populations

We investigated three populations: patients with IS, asymptomatic offspring, born from at least one scoliotic parent, who are considered at-risk of developing scoliosis and healthy controls without any family history of scoliosis. A group of 44 patients with IS (19 IS patients with curvatures greater than 45° and 25 IS patients with curvatures between 10° and 29°), as well as 31 asymptomatic children at-risk of developing scoliosis and 42 healthy control subjects were recruited and examined every 6 months. All subjects were Caucasians. Demographic and clinical characteristics are shown in Table 1, 2 and 3 respectively.

Validation of CDS assay as prognostic test for IS

We previously demonstrated that melatonin signaling is impaired in osteoblasts obtained intraoperatively from severely affected IS patients using a classical cAMP assay.⁷ However, such an assay has a considerable number of limitations in terms of sensitivity and reproducibility since cAMP levels are subject to great variations and rapid degradation inside any cell type, which could limit its utility for a clinical test. Therefore, we examine CDS, another cell-based assay, which is more rapid, sensitive, and accurate than classical cAMP assays, and advantageously offers a direct measure of Gi protein-mediated signaling. Since melatonin can initiate cellular effects via diverse mechanisms, including the coupling of its receptors to Gi proteins, we first examined the ability of CDS to detect the relative part of the Gi protein-mediated pathway in melatonin signaling by blocking this pathway with pertussis toxin (PTX). This toxin ADP-ribosylates the α_i subunit of the heterotrimeric

Gi protein and thereby prevents its activity. Our results show that the PTX treatment dramatically inhibits the cellular response measured by CDS in MG63 osteoblast cell line following stimulation with either melatonin or iodomelatonin (Fig. 1). The inhibition extent was about 75% for melatonin and 90% for iodomelatonin, indicating the major effects Gi proteins have on melatonin signaling measured by CDS.

In order to investigate whether dysfunction of melatonin signaling in IS patients can also be detected by CDS measurements, we re-examined osteoblasts derived from healthy controls and three severely affected IS patients (surgical cases exhibiting a Cobb's angle $>45^\circ$) previously tested. We first used a cAMP assay to confirm the functional status of melatonin signaling in these cells. As expected, osteoblasts from IS patients exhibited high cAMP production in response to melatonin subsequently to forskolin stimulation when compared to those from healthy control subjects (Fig. 2A). Furthermore, the extent of this production was different between the three IS patients. These data are consistent with our previous findings,⁴ confirming thus the occurrence of a melatonin signaling dysfunction of different degrees in the osteoblasts of these patients. We then examined the ability of our CDS assay to detect this defect by studying the effect of various concentrations of melatonin and iodomelatonin on CDS response of these cells. Results obtained show that melatonin and iodomelatonin evoked similar responses in a concentration-dependent manner in osteoblasts from both control and IS patients. However, the magnitude of response was significantly lower in IS osteoblasts (Fig. 2B). On the other hand, a significant difference in the extent of CDS response was also observed between the three IS patients. These results indicate that the dysfunction of melatonin signaling in IS and the

disparity of this defect among patients can be detected by our functional assay in IS patients.

Interestingly, the screening of PBMCs in response to melatonin or iodomelatonin, using CDS, revealed similar features than those obtained with osteoblasts (Fig. 2B-2C), demonstrating that melatonin signaling dysfunction also occurs in PBMCs and enabling us to validate their clinical use for the evaluation of the functional status of melatonin signaling in IS patients and asymptomatic children.

Diagnostic and prognostic performances of CDS assay for IS

A first cohort of individuals with or without IS or considered at-risk of developing this disease was tested to determine the sensitivity and specificity of our cell-based assay with CDS by investigating the functional status of melatonin signaling in PBMCs from each of these individuals.

Figure 3A shows that all patients with IS were less responsive to iodomelatonin when compared to healthy volunteers tested; similar results were obtained with melatonin (data not shown), thereby indicating a high selectivity for this assay. The minimal magnitude measured in PBMCs from healthy volunteers in response to iodomelatonin was 124 ohms under our experimental conditions. None of the IS patients tested exhibited a CDS response reaching such magnitude. The maximal magnitude measured in IS patients was 110 ohms, while the minimum was 16 ohms. Thus, we have considered normal melatonin signaling all CDS responses to iodomelatonin greater than 120 ohms. Then, we fixed the CDS response range between 10 and 40 ohms for IS patients of group 1, 40 and 80 ohms for those of group 2, and finally between 80 and 120 ohms for IS patients of group

3. Of all IS patients tested, 11% (5/44), 30% (13/44) and 59% (26/44) were diagnosed as belonging to the functional groups 1, 2 and 3, respectively. According to their CDS response, there was no ambiguity in classifying these patients. The mean of CDS response for group 1 was 27.46 ± 3.26 and 62.92 ± 2.47 for group 2, while it was 98.59 ± 1.26 for group 3 and 157.86 ± 3.97 for the control group. These differences were highly significant ($P < 0.001$). Our results demonstrate that the functional test based on the evaluation of melatonin signaling in PBMCs with the CDS assay effectively distinguishes patients with IS not only from healthy individuals but also from different functional groups. These results demonstrate the sensitivity, specificity and dynamic range of this functional test as a diagnostic tool.

Interestingly, the functional screening of PBMCs from asymptomatic children born from at least one scoliotic parent revealed that the melatonin signaling defect can be detected in this cohort before scoliosis onset (Fig. 3B). Of all asymptomatic children tested, 61% (19/31) exhibited a CDS response in the range of normal magnitudes (>120 ohms), whereas the CDS response was reduced in 39% (12/31). The latter were considered more susceptible to developing scoliosis. Interestingly, among these 12 children at high risk, 4 have developed a spinal deformity 24 months later, exhibiting a mean Cobb angle of 11.7° as confirmed by radiography (data not shown).

Discussion

Melatonin signaling dysfunction could potentially explain the majority of abnormalities reported in IS since melatonin receptors and signaling activities are normally found in most if not all tissues and systems affected in IS, thus offering a very innovative and unified concept to explain the etiology of IS. The results presented in this report confirmed that patients with IS exhibit a melatonin signaling dysfunction, manifesting in different degrees between patients and leading to classification of patients into three functional subgroups. This impairment was observed in osteoblasts and PBMCs, indicating a probable systemic dysfunction of melatonin signaling in IS. In addition to these observations, the current report also shows that dysfunction of melatonin signaling is detectable in some asymptomatic children and occurs before the spinal deformity appears. From these observations, we propose the evaluation of the functional status of melatonin signaling in PBMCs with CDS as a routine clinical test for the early diagnosis of IS.

The rationale for using this CDS assay to investigate melatonin signaling is based on the fact that this highly sensitive label-free technology is able of detecting cellular responses even with low endogenous receptor levels and a minimal number of cells. As with the cAMP assay, we found that the screening of cells with CDS also allowed a classification of IS patients into three functional subgroups, thus validating this procedure for distinguishing the functional status of melatonin signaling among IS patients.

Our interest for the evaluation of PBMCs as a tool for this functional test was motivated by the fact that PBMCs are easily accessible via simple blood sampling for evaluating the efficiency of melatonin signal transduction.^{15;16} Furthermore, there is no

need to establish cell cultures since the test can be performed in cell suspension with either fresh or frozen PBMCs, which could facilitate the clinical application of our functional assay.

Interestingly, we found that PBMCs from IS patients exhibited a melatonin signaling dysfunction in similar patterns obtained with osteoblasts, characterized by a disparity in the dysfunctional degree among patients. These results not only validate of our previous classification, but also suggest that the mechanism triggering melatonin signaling defects in IS could be the same in both bone and blood cells. Accordingly, the observation that melatonin effects measured by CDS take place essentially through a heterotrimeric Gi protein supports the hypothesis that the functional deficiency of Gi proteins could be the determinant factor in the events leading to melatonin signaling dysfunction. The mechanistic details of such a phenomenon remain to be elucidated.

Several lines of evidence indicate that genetics is the most significant factor of IS,¹⁷ and the current concept considers IS as a multigene dominant condition with variable phenotypic expression.¹⁸ Results presented here support such a concept. Indeed, the difference in the extent of melatonin signaling dysfunction leading to classification of patients into three groups and the lack of connection between studied individuals, might suggest, at least, the existence of three different genes as being the major influence for the etiopathogenesis of IS.

Although gene expression tests are an emerging diagnostic approach,¹⁹⁻²¹ the high level of heterogeneity in the nature of the encoded susceptibility genes for IS can render difficult the identification of specific genes. Indeed, the potential differences in the degree

of IS heritability have been much reported.²²⁻²⁴ Based on these considerations, classification of individuals by evaluating melatonin signaling in PBMCs with CDS might constitute an advantageous procedure because it can be performed without prior knowledge of specific mutated genes. Moreover, this classification relies on the analysis of endophenotypes rather than phenotypes, and therefore may give simpler clues to the genetics underpinnings of this disease.

Here, we provide evidence for the potential usefulness of such a cell-based assay as a prognostic test to identify sooner the asymptomatic children at-risk of developing IS. Indeed, it is well accepted that the prevalence of this disease is increased in asymptomatic children born from at least one affected parent. Results presented here corroborate this fact and confirm that this category of children is more susceptible of developing IS. The risk of developing scoliosis was predicted in 39% of asymptomatic children tested, and so far we obtained a clinical confirmation for 33% of them (4/12) with the detection of a spinal deformity (over 10°) several months later. The lack of spinal deformity manifestation in the remaining suspected children is likely related to their young age. Indeed, the deformity of the spine is recognized to occur in children between 10 and 16 years of age. However, the mean age of asymptomatic children enrolled in the present study was 10.03 ± 3.2 years, and they have been followed up for only 24 months. Therefore, not all tested children would have reached the appropriate age for developing the spinal deformity during this period.

Nevertheless, among all tested children of age 10 or older, neither asymptomatic children exhibiting normal melatonin signaling nor control children with no familial history of scoliosis story have developed any spinal deformity during the study period.

The present study shows that the evaluation of the functional status of melatonin signaling in PBMCs may be an easy test not only for identification of children at high risk of developing scoliosis, but also for classification of those currently suffering from this disease. The main limitation of this study is, however, the limited number of affected subjects tested at an early stage of IS and in the asymptomatic pediatric population. Furthermore, we also need to test larger series of IS patients at the earliest onset of the disease to determine whether our functional assay will be sensitive enough to determine which cases will develop mild scoliosis with a slow or limited progression versus those cases that will generate severe curves. To these ends, we have undertaken the study of a larger cohort of IS patients to determine if some co-morbidities associated with IS are more prevalent in specific functional subgroups. Nevertheless, our functional scoliosis test can be performed without any prior knowledge of any potentially defective genes causing IS. We believe that this test may be used as a routine clinical test for the rapid diagnosis of the risk of developing scoliosis.

Acknowledgements

We are indebted to the subjects and families who participated in this study. We also thank Ginette Lacroix for coordinating the study; Ginette Larouche for her nursing support as well as the nursing teams at Sainte-Justine University Hospital, The Montreal's Children Hospital, and The Shriners Hospital for Children in Montreal. Supported by grants from La Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France, Paris, France (to Dr. Moreau and Dr. Labelle) and from Paradigm Spine LLC, New York, USA (to Dr. Moreau). Mr. Azeddine is supported by a Canadian Institute of Health Research/MENTOR training program PhD Scholarship. Dr. Moreau reports having received from Paradigm Spine LLC research grants and served on the scientific advisory board of Paradigm Spine LLC. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

1. Weinstein SL, Dolan LA, Cheng JC et al. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* 2008;371:1527-37.
2. Society SR. Morbidity & Mortality Committee annual Report 1997.
3. Weiss HR, Goodall D. Rate of complications in scoliosis surgery - a systematic review of the Pub Med literature. *Scoliosis*. 2008;3:9.
4. Goldberg MS, Mayo NE, Poitras B et al. The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part I: Description of the study. *Spine* 1994;19:1551-61.
5. Poitras B, Mayo NE, Goldberg MS et al. The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part IV: Surgical correction and back pain. *Spine* 1994;19:1582-8.
6. Danielsson AJ. What impact does spinal deformity correction for adolescent idiopathic scoliosis make on quality of life? *Spine* 2007;32:S101-S108.
7. Moreau A, Wang DS, Forget S et al. Melatonin Signaling Dysfunction in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine* 2004;29:1772-81.
8. Letellier K, Azeddine B, Blain S et al. [Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis and new molecular concepts]. *Med.Sci.(Paris)* 2007;23:910-6.

9. Peters MF, Knappenberger KS, Wilkins D et al. Evaluation of cellular dielectric spectroscopy, a whole-cell, label-free technology for drug discovery on Gi-coupled GPCR. *J Biomol.Screen.* 2007;12:312-9.
10. Verdonk E, Johnson K, McGuinness R et al. Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay.Drug Dev.Technol.* 2006;4:609-19.
11. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P et al. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol.Life Sci.* 2009;66:516-25.
12. Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 2004;28:559-76.
13. Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J.Bone Joint Surg.Br.* 1968;50:24-30.
14. De George FV, Fisher RL. Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects. *J.Med.Genet.* 1967;4:251-7.
15. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18:537-9.

16. Garcia-Perganeda A, Pozo D, Guerrero JM et al. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J.Immunol.* 1997;159:3774-81.
17. Kesling KL, Reinker KA. Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine* 1997;22:2009-14.
18. Roach JW. Adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop.Clin.North Am.* 1999;30:353-viii.
19. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J et al. Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005;102:11023-8.
20. Moore DF, Li H, Jeffries N et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation* 2005;111:212-21.
21. Sharma P, Sahni NS, Tibshirani R et al. Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R634-R644.
22. Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV et al. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. *Am.J.Med.Genet.* 1999;86:389-94.
23. Blank RD, Raggio CL, Giampietro PF et al. A genomic approach to scoliosis pathogenesis. *Lupus* 1999;8:356-60.

24. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2000;82-A:1157-68.

Figure legends

Figure 1. Contribution of Gi proteins in melatonin signaling is detected by CDS. The MG63 osteoblast cell line was serum-starved for 16h in the absence or presence of 100 ng/mL of PTX to inhibit the α_i subunit of Gi protein. Cells were then stimulated with 10 μ M of melatonin or iodomelatonin and cellular responses were measured with CellKeyTM as described in the Material and Methods section. Data in the graph were generated from maximum impedance responses and correspond to the mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate.

Figure 2. Melatonin signaling dysfunction is demonstrated using two different methods. In panel A, osteoblasts from control patients (non-IS) and patients with IS were pre-treated with forskolin to induce adenylate cyclase activity and subsequent cAMP production. Cells were then challenged with increasing concentration of melatonin and the functional status of melatonin signaling was estimated by the ability of melatonin to reduce cAMP levels. Data were normalised with cAMP production induced by forskolin in the absence of melatonin. In panels B and C increasing concentrations of melatonin or iodomelatonin were applied to osteoblasts and lymphocytes from healthy control subjects and patients with IS. The subsequent cellular response was measured by CDS in the CellKeyTM instrument. Curves were generated from maximum impedance magnitude. Data were normalized to maximal response in cells from control patients, and are expressed as mean \pm SE of three independent experiments performed in duplicate.

Figure 3. Precision and dynamic range of the functional assay using the CellKeyTM system. Graphs illustrate a dynamic range of values obtained in PBMCs from control

subjects relative to those from (A) IS patients belonging to functional group 1, 2 and 3, (B) asymptomatic children at-risk. All groups were measured by CDS in response to 300 μ M of iodomelatonin. Each point represents the mean of three experiments for each individual subject and the assay coefficient of variation found was typically less than 10%.

Table 1. Clinical data of AIS patients studied.

Case Number	Gender	Age	Curve Pattern	Cobb Angle
113	Female	9.7	10	Right Thoracic
151	Female	13.1	31	Right Thoracic
155	Female	15.4	20	Left Thoracolumbar
159	Female	8.3	7	Left Lumbar
165	Female	10.8	26 23	Right Thoracic Left Lumbar
168	Female	14.2	16 18	Right Thoracic Left Thoracolumbar
208	Female	9.8	26	Left Thoracolumbar
254	Female	15.2	28	Left Thoracolumbar
271	Female	12.4	23	Right Thoracic
275	Female	11.0	27 1	Right Thoracic Left Lumbar
276	Female	13.1	19 19	Right Thoracic Left Lumbar
281	Female	12.6	7	Left Thoracolumbar
282	Female	9.7	20	Left Lumbar
302	Female	14.4	14 12	Right Thoracic Left Lumbar
306	Female	13.1	13 18	Right Thoracic Left Lumbar
327	Female	16.4	21	Right Thoracic
336	Female	14.0	6 12	Right Thoracic Left Lumbar

404	Female	14.6	25	Right Thoracic
425	Female	24.6	52	Left Thoracolumbar
475	Female	13.2	19	Left Thoracolumbar
541	Male	15.3	13	Right Thoracic
542	Female	15.6	21 26	Right Thoracic Left Thoracolumbar
543	Female	10.9	10 8	Right Thoracic Left Thoracolumbar
544	Female	15.1	8 2	Left Thoracic Right Thoracolumbar
548	Female	15.6	16	Right Lumbar
1020	Female	19.9	59 55	Right Thoracic Left Lumbar
1060	Female	12.0	48 38	Right thoracic Left lumbar
1198	Female	16.3	20	Right Thoracolumbar
1311	Female	15.52	42	Right thoracic
1132	Female	13.11	35	Right thoracic
1385	Female	16.1	27 42 23	Left Thoracic Right Thoracic Left Lumbar
1468	Male	15.5	69	Right Thoracolumbar
1474	Male	17.9	54 52	Right Thoracic Left Lumbar
1488	Male	15.4	87	Right Thoracic
1513	Female	15.6	11 12	Right Thoracic Left Lumbar

1520	Female	14.6	54 42	Right Thoracic Left Thoracolumbar
1545	Female	13.5	57	Right Thoracic
1549	Female	14.8	24 55	Right Thoracic Left Thoracolumbar
1550	Female	12.3	60 51	Right Thoracic Left Lumbar
1552	Female	18.5	30 66 37	Left Thoracic Right Thoracic Left Lumbar
1554	Female	14.7	49	Right Thoracolumbar
1557	Female	12.1	83 54	Right Thoracic Left Lumbar
1562	Female	19.1	51 41	Right Thoracic Left Lumbar
1566	Female	12.2	53 74	Left Thoracic Right Thoracic

*All reported data is that from first collection date.

Table 2. Clinical data of asymptomatic at-risk subjects studied.

Case Number	Gender	Age
3004	Female	8.6
3006	Male	5.8
3009	Female	3.0
3016	Female	10.5
3018	Female	11.3
3023	Female	9.5
3027	Female	14.1
3030	Male	10.7
3040	Male	9.7
3043	Female	4.7
3054	Female	8.2
3057	Female	15.3
3058	Female	8.0
3062	Male	14.5
3065	Female	12.2
3067	Female	12.0
3068	Male	12.0
3070	Female	8.5
3071	Male	5.5
3080	Female	10.0
3081	Male	16.2
3082	Female	7.6
3095	Male	10.7
3096	Female	8.5
3098	Male	12.5
3099	Female	10.4
3115	Male	10.6
3116	Female	9.5
3123	Female	10.8
3124	Male	15.0
3159	Female	5.1

*All reported data is that from first collection date

Table 3. Clinical data of healthy control subjects studied.

Case Number	Gender	Age
5	Female	10.6
11	Male	11.3
20	Female	10.0
21	Female	10.4
23	Male	10.3
33	Male	10.1
43	Female	14.9
60	Female	14.4
61	Female	16.3
68	Female	12.9
69	Female	14.5
86	Female	13.7
4110	Female	17.3
4112	Male	13.6
4115	Female	14.7
4121	Male	13.8
4124	Female	12.8
4126	Female	14.6
4131	Male	15.5
4135	Male	15.8
4137	Female	16.8
4138	Female	13.1
4140	Male	14.9
4142	Female	15.3
4143	Female	13.1
4148	Male	14.8
4149	Female	15.4
4150	Female	15.2
4159	Male	14.0
4161	Male	13.3
4174	Female	12.9
4179	Female	16.6
4181	Male	15.9
4182	Female	15.7
4190	Male	16.3
4191	Female	15.7
4193	Female	17.3
4195	Female	16.3
4200	Female	13.6
4205	Male	11.3
4206	Male	11.4
4209	Female	15.8

*All reported data is that from first collection date.

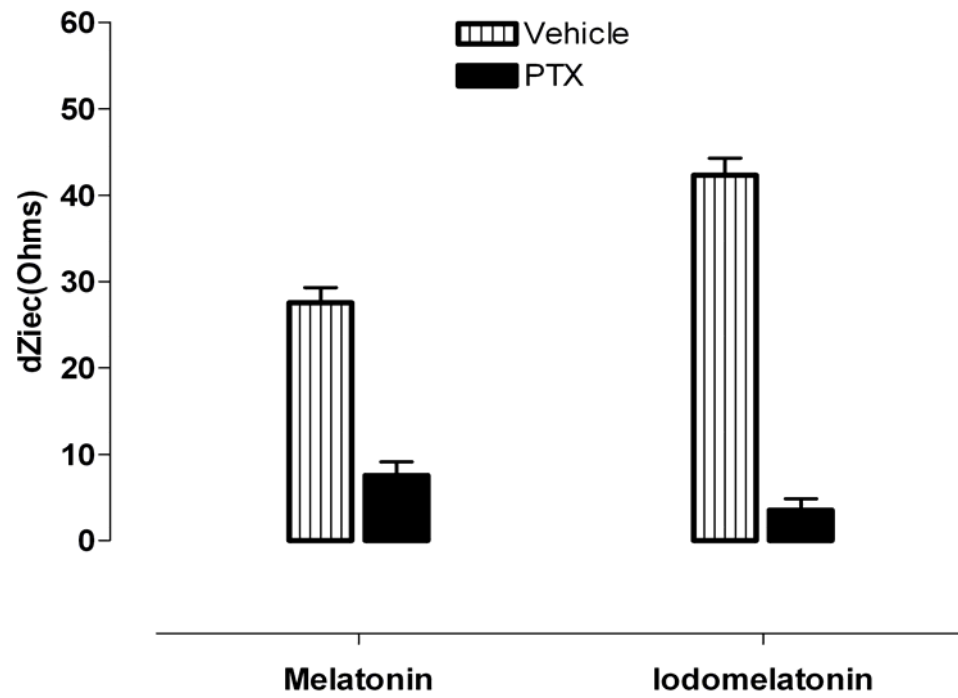


Figure 1

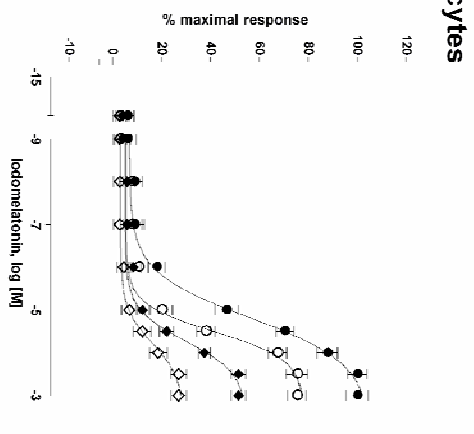
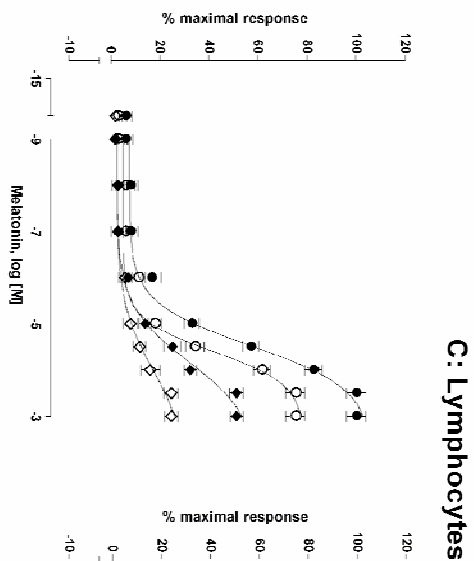
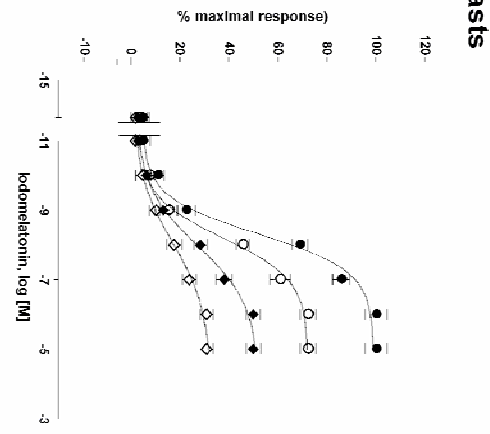
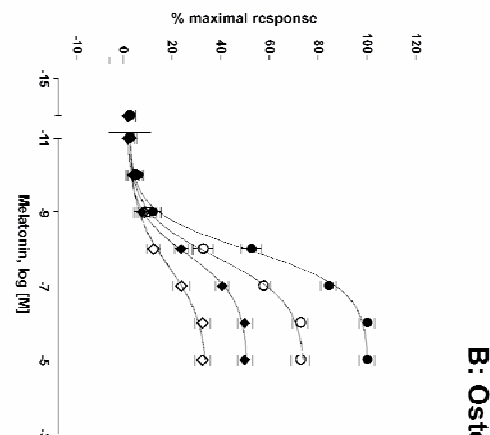
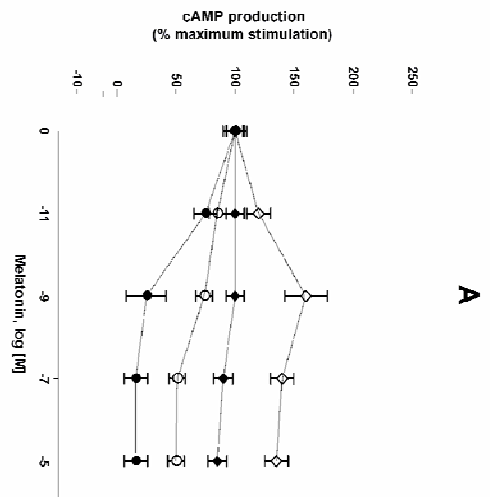


Figure 2

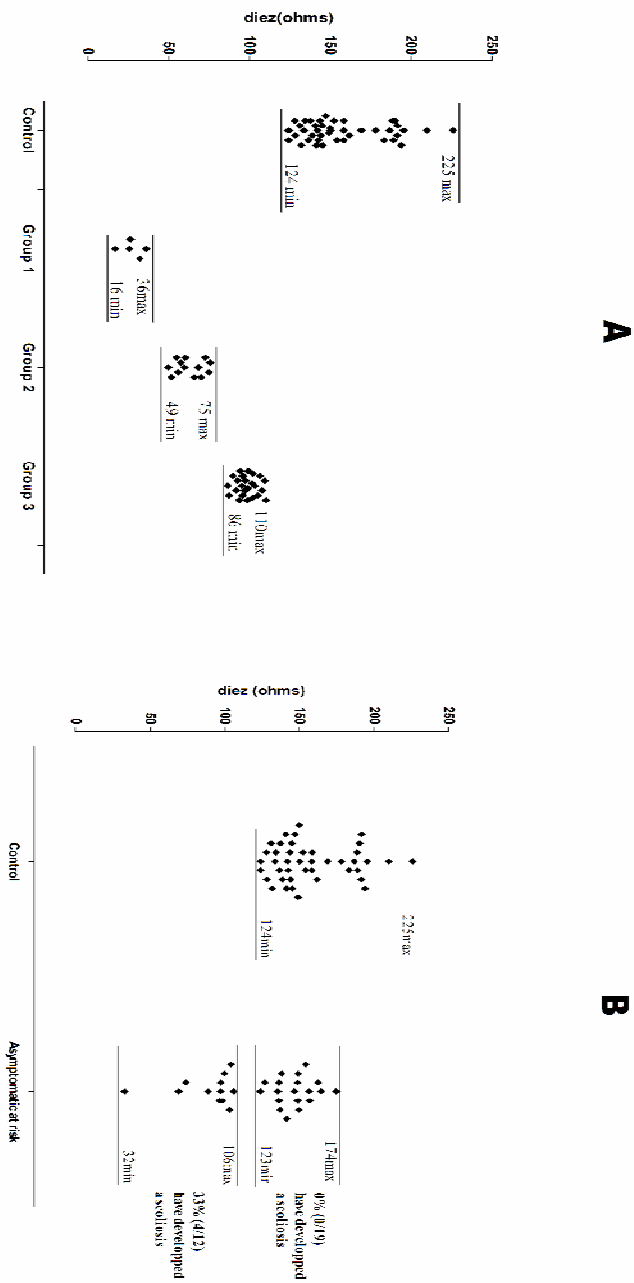


Figure 3

Régulation de la voie de signalisation de la mélatonine.

Introduction

Nous avons démontré précédemment que le défaut de signalisation de la mélatonine observé chez les patients SIA est du à une phosphorylation accrue des protéines Gi. Parmi les kinases pouvant phosphoryler les protéines Gi, on trouve PKC δ (Murthy & coll. 2000). D'où l'intérêt d'étudier son implication dans la voie de signalisation de la mélatonine. Afin que cette kinase puisse exercer son effet, elle doit interagir avec son substrat, nous avons donc vérifié la présence de cette kinase dans le complexe formé par le récepteur de la mélatonine MT2. L'étude des interactions de ce récepteur avec PKC δ ou Rack1 a montré différentes interactions selon les différents groupes fonctionnels testés chez les patients SIA et indiquant ainsi que le défaut de signalisation de la mélatonine pourrait être causé en partie par ces différences d'interaction.

**Troisième publication: Molecular determinants of
melatonin signaling dysfunction in AIS.**

Article publié dans le journal of Clinical Orthopaedic and Related Research 2007
Sep; 462:45-52.

Ma participation dans cet article :

J'ai participé à la planification des expériences nécessaires pour cet article. Les tests d'AMPC, et les co-IP. J'ai écrit la première version de cet article. J'ai aussi participé dans l'analyse des données, la conception des figures et la révision du manuscrit final.

MOLECULAR DETERMINANTS OF MELATONIN SIGNALING DYSFUNCTION IN AIS

Bouziane Azeddine¹ MSc, Kareen Letellier¹ BSc, Da Shen Wang¹ MD/PhD, Florina Moldovan^{1,2} MD/PhD and Alain Moreau PhD^{1,2,3}

¹Research Centre, Sainte-Justine University Hospital, Montreal;

²Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal;

³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal;

Running title: Molecular understanding of melatonin in AIS

This work was supported by two research grants from La Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France (to A.M.).

An informed consent was obtained for each subject enrolled in this study as approved by Sainte-Justine University Hospital's Ethical Committee, The Montreal Children's Hospital Ethical Committee and the McGill University Review Board.

Correspondence to: Dr. Alain Moreau, Research Center, CHU Sainte-Justine, Molecular Genetics Laboratory of Musculoskeletal Diseases (room 4734), 3175 Cote-Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, CANADA

Phone: (514) 345-4931 ext: 3476

Fax: (514) 345-4801

ABSTRACT

Presently, the genetic cause of adolescent idiopathic scoliosis (AIS), the most common form of scoliosis, remains unclear. Among many hypotheses, the neuroendocrine hypothesis involving a melatonin deficiency as the source for AIS generated the greatest interest and controversy since no decrease in circulating melatonin level has been observed in a majority of studies. Previously, we have reconciled the role of melatonin in AIS by demonstrating a melatonin signaling dysfunction occurring in osteoblasts derived from AIS patients, which contrasted with similar cells isolated from healthy subjects. We found that this difference is caused in AIS cells by increased phosphorylation of serine residues affecting the activity of G inhibitory proteins normally associated with melatonin cell surface receptors. Here we propose a preliminary molecular classification of patients with AIS based on the cellular response to the melatonin (cAMP) and distinct protein-protein interactions. These interactions include those between protein kinase C delta (PKC δ) and MT2 melatonin receptors or PKC δ and the receptor for activated protein C kinase 1. This finding could help in future molecular classification of patients with AIS.

INTRODUCTION

Although adolescent idiopathic scoliosis (AIS), the most common form of scoliosis, is a disease affecting a large number of young adolescents (0.2–6% of the population), its genetic causes remain unclear.^{11,19} Evidence of a genetic influence for AIS comes from a number of sources, including epidemiologic studies of family history and family clustering, twin studies, and exploration of rare genetic disorders.^{21–23,30} These studies have also highlighted potential differences in the degree of AIS heritability. This suggests a high level of heterogeneity in the nature of the encoded susceptibility genes, which is reflected by the increasing number of loci identified in AIS linkage studies and discrepancies among these studies. The pathophysiological relevance of susceptibility loci has yet to be confirmed, and this illustrates our incomplete knowledge of the genetics and biology of AIS.

We previously reported a melatonin signaling dysfunction occurring in a cell-autonomous manner in osteoblasts derived from patients with AIS exhibiting severe scoliotic deformities.²⁵ Melatonin signaling dysfunction in osteoblasts derived from patients with AIS generated three types of response in the presence of varying concentrations of melatonin,²⁵ which allowed a functional classification of patients with AIS. Further investigation led us to conclude such a signaling defect was not caused by a deregulation or mutations of MT1 and MT2 melatonin receptor subtypes as also demonstrated by the works of Morcuende et al²⁴ and other reports on the natural and engineered mutations of MT1 or MT2 receptor subtypes.^{14, 24} Based on this conclusion, we focused our attention on the next possible target: G inhibitory proteins (Gi) coupled to both melatonin receptors. We demonstrated a hypofunctionality of Gi proteins caused by an increased serine

phosphorylation leading to their inactivation. Thus, the control of the phosphorylation of Gi alpha subunit is of importance in the regulation of biologic processes and provides a functional and more rational approach to probe candidate molecules in AIS pathogenesis. This prompted us to investigate known kinases and phosphatases modulating Gi protein functions. Among them, PKCd (protein kinase C delta), a serine-threonine kinase, was of interest owing to its property of phosphorylating Gi proteins in vitro.^{18,27} PKC family members are involved in numerous biologic processes and their catalytic activities are modulated by tyrosine phosphorylation involving members of the Src tyrosine kinase family.^{5,6} Interestingly, the translocation of PKC δ within the cell membrane involves the specific interaction of this serine kinase with RACK1 (receptor for activated protein C kinase 1), which acts as a scaffold protein binding only the activated form of PKC δ .²⁹ The pathophysiological relevance of PKC δ in the melatonin signaling defect observed in severely affected patients with AIS is further strengthened by the fact that serine/threonine kinase activity of PKC δ and Gi proteins functions are both regulated by a tyrosine kinase-phosphatase system.⁴ We demonstrated addition of tyrosine kinase inhibitors prevented or reduced serine-phosphorylation of all Gi proteins in the absence of melatonin in normal osteoblasts,^{4,25} whereas in AIS osteoblasts, such a process was impaired.²⁵

We challenged our initial findings by investigating a larger series of AIS cases and control subjects and asked whether these three melatonin responses involve molecular changes affecting PKC δ and/or RACK1 interactions with the melatonin signal transduction machinery in osteoblasts isolated from patients with AIS.

MATERIALS AND METHODS

We investigated the component of melatonin signaling complexes using bone specimens taken intraoperatively during spine or trauma surgeries of patients with AIS and non-AIS (control subjects) respectively. Non-AIS tissues were obtained from patients of the same age group (range, 10–19 years) who required surgery following trauma or other diseases. Evaluation of melatonin signaling was performed in primary osteoblast cell cultures derived from AIS patients ($n = 90$) and control subjects ($n = 10$) owing to the ability of melatonin to inhibit cAMP synthesis through binding of its membranous receptor MT1 and MT2. In order to identify and characterize the origin of the melatonin signaling dysfunction observed in patients with AIS, we immunoprecipitated complexes bound to MT2 melatonin receptors in osteoblast membrane extracts obtained from AIS and control subjects. This strategy allowed us to demonstrate changes in known MT2 interacting partners as previously reported (increased Gi proteins phosphorylation)²⁵ as well as to discover a novel partner as presented in this study.

All patients with AIS and control subjects were examined by one of the six orthopaedic surgeons (HL, BP, C-HR, GG, JO, SP) participating in this project (Tables 1, 2). Hereditary links were established by asking the patients and their relatives about the presence of a spinal deformity affecting a family member. Determination of the causes underlying the three type of functional responses were performed as a preliminary proof of concept by selecting at least one patient with AIS in each functional group as previously reported.²⁶ We selected patients with AIS exhibiting a right thoracic curve pattern (Lenke Type 1¹⁷) with a minimum age at the time of surgery of 12 years (mean, 16 years; range, 12–18 years).

In all AIS cases, bone specimens were obtained intraoperatively from vertebrae (varying from T3 to L4 according to the surgical procedure performed), while with trauma cases bone specimens were obtained from other anatomical sites (tibia or femur, and in one case from an iliac crest biopsy). Bone fragments were reduced to smaller pieces with a bone cutter in sterile conditions. The fragments were incubated at 37°C in 5% CO₂ in a 100-mm culture dish in the presence of Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% fetal bovine serum (certified FBS; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen). After a 30-day period, the osteoblasts derived from the bone pieces were separated at confluence from the remaining bone fragments by trypsinization.

Melatonin signaling was assessed by investigating the ability of Gi proteins to inhibit stimulated adenylyl cyclase activity in intact osteoblasts. Osteoblasts from 90 patients with AIS and 10 control subjects were seeded in quadruplicate on 24-well plates (1×10^5 cells per well) and incubated with the vehicle alone, DMSO (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), or forskolin (10^{-5} M; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to stimulate the cAMP formation. Inhibition curves of cAMP production were generated by adding melatonin to the forskolin-containing samples in concentrations ranging from 10^{-11} M to 10^{-5} M (Sigma-Aldrich) in a final volume of 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium with 0.5% BSA (Sigma-Aldrich). After 30 minute incubation at 37°C, the cells were lysed and the sample centrifuged at 4°C. The cAMP content was determined in 200-μL aliquots of the supernatant using an enzyme immunoassay kit (Amersham-Pharmacia Biosciences, Mississauga, ON, Canada). All assays were performed in duplicate.

Coimmunoprecipitation assays were performed with osteoblast membrane extracts to determine physical interaction at the protein level between MT2 melatonin receptor and PKC δ and between PKC δ and RACK1. Osteoblast membrane extracts were prepared using cells grown to confluence in 10-cm tissue culture dishes, rinsed twice in ice-cold phosphate-buffered saline, and scraped off their plastic support in 200- μ L of ice-cold buffer, 5 mM Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (two tablets of Complete/50 mL of buffer; Roche Diagnostic Corp, Indianapolis, IN), and then homogenized with a Polytron (Brinkman, Westbury, NY) for 5 seconds at 30,000 rpm. Lysate was centrifuged at $450 \times g$ for 5 minutes at 4°C and supernatant (2 mL) was added on the top of 9 mL of a 35% sucrose cushion in ultracentrifugation tubes (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA). Plasma membrane fractions were sedimented by ultracentrifugation at $150,000 \times g$ for 90 minutes at 4°C, and the pellet membrane was resuspended in 1 mL of ice cold buffer, 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail, and then incubated with or without melatonin (10^{-7} M) for 1 hour at 25°C. Membranes were pelleted by centrifugation at $18,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C. The pellet was washed with ice-cold buffer, 75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail, and then resuspended in the same buffer containing 1% Triton X-100 at a ratio of 1% detergent per milligram of protein and shaken overnight at 4°C. Nonsolubilized membrane proteins were removed by centrifugation at $18,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C. Protein determination was performed by Bradford's method⁷ using BioRad protein assay reagents (BioRad, Mississauga, ON, Canada), and 100 μ g of proteins were used for each immunoprecipitation assay. The Triton X-100 concentration was adjusted to 0.2%, and human MT2 antibodies or RACK1 antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) were added to a final dilution of 1:80.

Extracts were incubated for 18 hours at 4°C with continuous gentle mixing. During the last 6 hours, 50 µL of a 50% (v/v) Protein A-agarose suspension was added. After centrifugation for 1 minute at $5000 \times g$, supernatants were decanted and the agarose beads washed five times with 1 mL of ice-cold buffer, 75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA protease inhibitor cocktail, and 0.05% Triton X-100.

AIS cases (n = 90) and control subjects (n = 10) were investigated for cAMP accumulation in presence of varying concentration of melatonin. To determine whether differences between the three groups and controls were significant, we performed an analysis with parametric test (Student's t test) using STATISTICA software. Significance was defined as $p = 0.05$.

RESULTS

Three groups of responses to the melatonin exist (Fig 1). In the first group (n = 22), treatment with increasing concentrations of melatonin (ranging from 10^{-11} M to 10^{-5} M) led to increasing intracellular accumulation of cAMP, which contrasted with the inhibitory curves obtained with control subjects. In the second group (n = 34), osteoblasts from patients with AIS did not respond to melatonin treatments even at pharmacologic doses (10^{-7} M) or higher (10^{-5} M). The third group (n = 34) showed a partial response only at pharmacologic doses, although at the physiological dose (10^{-9} M), no inhibition occurred. We observed variations between controls and group 1 ($p < 0.05$), and between controls and group 2 ($p < 0.05$), but no such variation between controls and group 3. We observed no association between any AIS functional groups and specific clinical variables (age, gender, curve patterns and pain).

We investigated the component of melatonin signaling complexes in osteoblasts as a first-run of experimentation to expand on our previous finding and to test whether such impaired responses were caused by distinct molecular changes regulating the melatonin signal transduction machinery. Coimmunoprecipitation assays revealed in the absence of melatonin treatment a novel complex composed of PKC δ and MT2 melatonin receptor in cells derived from AIS patients belonging to the functional Group 3 (n = 4) (Fig 2) and AIS patient #1138 (functional Group 1, n = 1). We detected no interaction either with control cells or AIS patient #1056 (functional Group 2, n = 1) (Fig 2). Addition of a physiological dose of melatonin in cell cultures (10^{-9} M) led to a 30% reduction in the interactions between PKC δ and MT2 receptor only in the case of AIS patient #1138 (functional Group

1); however in patient #1056 (functional Group 2), melatonin stimulates the interaction between MT2 and PKC δ . Control subjects and patients from group 3 did not show differences with or without melatonin treatment (Fig 2). We analyzed in parallel whether interaction between PKC δ and RACK1, a known interacting partner of PKC δ , were affected in cells derived from AIS patients and osteoblastic MG-63 cell line used as control. In MG-63 control cells, PKC δ interacts with RACK-1, and melatonin treatment did not affect this interaction, which contrasted with the cells from AIS patient #1138 (functional Group 1) in which no interactions were found. In the cases of AIS patient #1084 (functional Group 3), this interaction was seen in the absence of melatonin, but in patient #1056 (functional Group 2) this interaction was detected only in the presence of melatonin (10^{-9} M) (Fig 3).

DISCUSSION

In the largest series of AIS patients and control subjects tested so far, we demonstrated the existence of a defect in the transduction machinery that conveys the melatonin signal at the cellular level, thus confirming the relevance of our melatonin signaling pathway-driven strategy.

Results from this study are of interest because they could explain the majority of abnormalities associated with AIS as melatonin receptors, and signaling activities are normally found in all tissues and systems affected in AIS (Fig 4C, D). Thus, the detection of a melatonin signaling defect may offer an innovative and unifying concept to explain the etiology of AIS as opposed to the traditional paradigm that considers AIS as a multifactorial disorder (Fig, 4C, D). Indeed, a dysfunction in hormonal signaling may trigger multiple effects, which may be interpreted as arising from multifactorial causes. Interestingly, osteoblasts from patients with AIS classified in the first functional group (Group 1) showed an increase of intracellular cAMP level in the presence of melatonin. This atypical response could be explained by a switch of melatonin receptor coupling from G_i alpha-subunits that inhibit cAMP production to G_s alpha-subunits, which stimulate its production (data not shown, Letellier et al, manuscript in preparation). Indeed, the coupling of the MT2 receptor subtype with G_s was previously reported by Chan⁸ and switching between other G protein-coupled receptors and different G proteins was also demonstrated by Baillie et al.³ It has been proposed that this process is regulated by the phosphorylation of G protein-coupled receptors resulting in changes in G protein coupling specificity.^{16,31}

Apart from the obvious bone remodeling alterations in AIS, the choice of osteoblasts is further justified because persistent osteopenia has been observed in 30% of individuals with scoliosis, indicating that bone tissue is affected in AIS.^{2,9,10,12,15} Nonetheless, the restriction of this study to osteoblasts also represents a limitation since it remains to be proven whether AIS is caused by a systemic melatonin signaling impairment or through more localized defects in specific tissues like bone.

Comparison of patients with AIS who were tested revealed three curve-response types in the presence of melatonin, indicating the heterogeneity of the causes underlying such dysfunction. In keeping with the notion of more than one mechanism, we previously identified one mechanism involving increased serine residues phosphorylation of alpha-subunits of Gi proteins normally coupled to melatonin receptors.²⁵ Phosphorylation of the serine residues of Gi alpha subunit at their N-terminus is well known to block the formation of functional heterotrimers with G β and G γ subunits, thus preventing the inhibition of adenylyl cyclase activity in the presence of melatonin. To understand the nature and molecular mechanisms underlying each functional group, we investigated whether these functional groups' abnormal responses toward melatonin were caused by molecular changes in specific interactions between key components of the melatonin signal transduction machinery. We focused on PKC δ interactions because this serine/threonine kinase is known to phosphorylate Gi proteins (at least in vitro) and its enzymatic activities are modulated by tyrosine phosphorylation, two important criteria. Immunoprecipitation of all proteins complexed to MT2 melatonin receptor in osteoblast membrane using anti-MT2 antibodies were separated by electrophoresis on a denaturing gel, transferred on a membrane and putative interacting partners visualized by immunodetection performed with

specific antibodies such as anti-PKC δ antibodies. The results obtained from our coimmunoprecipitation assays uncovered a novel interaction between PKC δ and the MT2 melatonin receptor targeting more specifically AIS patients classified in the third functional group, which explains why we have tested more patients from this group. Physical interactions of PKC δ with few other G-protein coupled receptors have been demonstrated such as ET_A endothelin receptor²⁰ and purinergic receptors (P2Y₁ and P2Y₁₂)²⁶ and lead to receptor desensitization. Therefore, it is conceivable that a similar mechanism could reduce or block melatonin signaling activity in AIS patients classified in the third functional group independent of the presence of melatonin. This is in contrast with AIS patients belonging to the first functional group where PKC δ interaction with MT2 occurs only in the presence of melatonin. Nevertheless, the molecular mechanisms modulating the activation of melatonin signaling remain poorly understood, and more confirmational studies on group 1 and 2 patients with AIS are needed. Our data provide preliminary experimental evidence of a direct interaction of PKC δ with MT2 melatonin receptor subtype (functional group 3) and modulation of this interaction by melatonin for patients in functional groups 1 and 2, which conceptually supports our hypothesis that the three functional responses observed in AIS cells depend on distinct, subtle molecular changes targeting the melatonin signaling pathway. Similarly, coimmunoprecipitation assays also revealed distinct patterns of interactions between PKC δ and RACK1 among patients with AIS from each functional group (Fig 3); this finding further strengthened their molecular classification in accordance with their functional response as determined by the cAMP assays (Fig 1). According to the data obtained with AIS patients found in the third functional group, it seems MT2-PKC δ interactions are not dependent on RACK1 since this scaffold protein interacts with PKC δ

only in presence of melatonin. Confirmation of molecular changes involving PKC δ and MT2 or RACK1 will be necessary on a larger set of AIS cases to further understand the role of PKC δ in the regulation of melatonin signaling.

As of now, various parameters are used to better classify the patients, especially with regard to their curve pattern and to assess the risk of deformity progression based on the analysis of radiographs¹³ and, more recently, by sophisticated three-dimensional reconstruction techniques.^{1,28} These old and new classifications were developed to help surgeons to choose better treatments or improve surgical procedures for their patients. Conversely, our proposed molecular classification of AIS patients is not only a new tool to classify these patients, but represents a first step to establish a rationale for the development of tailored pharmacotherapies to treat and prevent AIS. Clinical validation of similar assays using lymphocytes instead of osteoblasts is currently in progress in Montreal and will require confirmation in new groups of AIS patients in different populations. Such a classification is advantageous because it can be performed without prior knowledge of the specific mutated genes, and this classification relies on the analysis of endophenotypes rather than the phenotypes. Endophenotypes can be defined as measurable components unseen by orthopaedic surgeons along the pathway between the disease and distal genotype and may represent simpler clues to the genetic underpinnings of the disease. Therefore, the proposed functional/molecular classification of patients with AIS could provide a more rational way to obtain better stratification of patients with AIS, resulting in more straightforward and successful genetic analysis to discover the causes of this disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the subjects and families who participated in this study. As well they would like to express their appreciation to the collaborating orthopedic surgeons who referred the subjects and were involved in this work: Dr. Hubert Labelle, Dr. Benoit Poitras, Dr. Charles-Hilaire Rivard, Dr. Stefan Parent, Dr. Jean Ouellet and Dr. Guy Grimard. Thanks are also owed to Mrs. Julie Joncas and Mrs. Ginette Lacroix for their technical support and helpful assistance as well as the nursing teams at Sainte-Justine University Hospital, The Montreal's Children Hospital and The Shriners Hospital for Children. This work was supported by two research grants from the Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France to A.M. Dr. Florina Moldovan is a recipient of a Scholarship from the FRSQ.

Reference List

1. Aubin CE, Labelle H, Ciolofan OC. Variability of spinal instrumentation configurations in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2007;16:57–64.
2. Bagnall K, Raso VJ, Moreau M, Mahood J, Wang X, Zhao J. The effects of melatonin therapy on the development of scoliosis after pinealectomy in the chicken. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:191–199.
3. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, Houslay MD. Beta-arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:940–945.
4. Barrett P, Choi WS, Morris M, Morgan P. A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin. *FASEB J.* 2000;14:1619–1628.
5. Benes C, Soltoff SP. Modulation of PKCdelta tyrosine phosphorylation and activity in salivary and PC-12 cells by Src kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1498–C1510.
6. Bradford MD, Soltoff SP. Involvement of protein kinases and phosphatases in tyrosine phosphorylation of PKCdelta in rat parotid acinar cells exposed to secretory stimuli. *Eur J Morphol.* 1998;36(suppl):176–180.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.

8. Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH.
Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun Nterminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal*. 2002;14:249–257.
9. Cheng JC, Guo X, Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a longitudinal follow up study. [see comments]. *Spine*. 1999;24:1218–1222.
10. Cheng JC, Tang SP, Guo X, Chan CW, Qin L. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study. *Spine*. 2001;26:E19–E23.
11. Connor JM, Conner AN, Connor RA, Tolmie JL, Yeung B, Goudie D. Genetic aspects of early childhood scoliosis. *Am J Med Genet*. 1987;27:419–424.
12. Courtois I, Collet P, Mouilleseaux B, Alexandre C. Bone mineral density at the femur and lumbar spine in a population of young women treated for scoliosis in adolescence. *Rev Rhum Engl Ed*. 1999;66:705–710.
13. Cruickshank JL, Koike M, Dickson RA. Curve patterns in idiopathic scoliosis. A clinical and radiographic study. *J Bone Joint Surg Br*. 1989;71:259–263.
14. Gerdin MJ, Mseeh F, Dubocovich ML. Mutagenesis studies of the human MT2 melatonin receptor. *Biochem Pharmacol*. 2003;66: 315–320.
15. Hans D, Biot B, Schott AM, Meunier PJ. No diffuse osteoporosis in lumbar scoliosis but lower femoral bone density on the convexity. *Bone*. 1996;18:15–17.
16. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol*. 2002;62:971–974.
17. Lenke LG, Betz RR, Harms J, Bridwell KH, Clements DH, Lowe TG, Blanke K.
Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83:1169–1181.

18. Lounsbury KM, Casey PJ, Brass LF, Manning DR. Phosphorylation of Gz in human platelets: selectivity and site of modification. *J Biol Chem.* 1991;266:22051–22056.
19. Machida M. Cause of idiopathic scoliosis. *Spine.* 1999;24: 2576–2583.
20. Markou T, Yong CS, Sugden PH, Clerk A. Regulation of protein kinase C delta by phorbol ester, endothelin-1, and platelet-derived growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2006;281:8321–8331.
21. Miller NH. Cause and natural history of adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Clin North Am.* 1999;30:343–352. vii. 22. Miller NH. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;401:60–64.
23. Miller NH, Schwab DL, Sponseller PD, Manolio TA, Pugh EW, Wilson AP. Characterization of idiopathic scoliosis in a clinically well-defined population. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;392:349–357.
24. Morcuende JAMR, Dolan L, Stevens J, Beck J, Wang K, Weinstein SL, Sheffield V. Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2003; 28:2025–2029.
25. Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, Poitras B, Labelle H, Rivard CH, Grimard G. Melatonin signalling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2004;29: 1772–1781.
26. Mundell SJ, Jones ML, Hardy AR, Barton JF, Beaucourt SM, Conley PB, Poole AW. Distinct roles for protein kinase C isoforms in regulating platelet purinergic receptor function. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1132–1142.
27. Murthy KS, Grider JR, Makhoul GM. Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of G(i-1) and G(i-2). *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C925–C934.

28. Pazos V, Cheriet F, Labelle H, Dansereau J. 3D reconstruction and analysis of the whole trunk surface for non-invasive follow-up of scoliotic deformities. *Stud Health Technol Inform.* 2002;91:296–299.
29. Rodriguez MM, Ron D, Touhara K, Chen CH, Mochly-Rosen D. RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry.* 1999;38:13787–13794.
30. Wise CA, Barnes R, Gillum J, Herring JA, Bowcock AM, Lovett M. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine.* 2000;25:2372–2380.
31. Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi: demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem.* 2002;277:31249–31256.

Figure legends:

Figure 1. Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts. Representative experiments showing the effect of increasing concentrations of melatonin (10^{-11} to 10^{-5} M) on forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in osteoblasts from control subject and patients with AIS (groups 1, 2 and 3). Data are expressed as mean \pm SEM, Differences between these groups are statistically different (t-student test($p < 0,05$)) at melatonin concentration 10^{-9} M, 10^{-7} M and 10^{-5} M.

Figure 2. Interaction of MT2 melatonin receptor with PKC δ .

Coimmunoprecipitation assays were performed with specific anti-MT2 antibodies using purified membrane fractions prepared from human MG-63 osteoblast culture (1, 2), trauma patients (n = 4) (3–10) and AIS patients (n = 6) (11–22). Osteoblasts were treated (+) or not (–) with melatonin (10^{-9} M). Membranes were probed with an antibody directed against PKC δ , a serine/threonine kinase. The specific band observed at 80 kDa corresponds to the molecular weight of PKC δ . This coimmunoprecipitation assay showed that PKC δ does not interact with MT2 melatonin receptor in control subjects (3–10) and control osteoblast MG-63 cells (1, 2), as opposed to the patient from group 3 (15–22) where we observed this interaction. Presence (+) or absence (–) of melatonin did not affect these interactions in patients from group 3, but affected the interactions in patients from group 1 and 2 (11–12 and 13–14).

Figure 3. Analysis of RACK1 interactions with PKC δ . Coimmunoprecipitation showed RACK1 interaction with PKC δ in normal human osteoblasts (MG-63 cell line) and osteoblasts derived from AIS patient cultures treated (+) or not (–) with melatonin. The

presence of interacting PKC δ was revealed by immunoblotting with a specific antibody reacting against human PKC δ protein. The lower band corresponds to IgG.

Figure 4. Causes of idiopathic scoliosis. Hypothesis concerning the role of cAMP, MT2, RACK1 and PKC δ in scoliotic and non scoliotic tissues is proposed here. Normal melatonin signaling pathway is summarized in (A) whereas (B) illustrates a model showing complex interactions interfering with the transmission of melatonin signal. In control cells, melatonin binds to its receptor and activates Gi alpha subunit to inhibit adenylyl cyclase activity. In AIS patients, Gi proteins are inactivated through phosphorylation by PKC δ and/or other kinases. Secondly, PKC δ interaction with MT2 melatonin receptor could lead to its phosphorylation and to desensitization of MT2 receptor. Melatonin signaling occurs in different systems and tissues (C). The potential systemic defects resulting from a melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis could be responsible for many physiological defects. This proposed model of adolescent idiopathic scoliosis could explain the multiplicity of disorders reported in AIS pathogenesis (D). In addition, sleep disturbances involving a neurohormonal deficit or dysfunction have been often reported in adolescent idiopathic scoliosis and other neuromuscular disorders suggesting the involvement of melatonin.

Table 1. Clinical variables associated with AIS patients tested.

Case Number	Curve Pattern	Gender	Age at Surgery (yrs)	Cobb Angle	Heredity
1067	R thoracic	F	14,74	32	No
1065	R thoracic	F	13,78	61	No
1013	R thoracic	F	14,96	54	Aunt and mother
1138	R thoracic	F	14,05	58	No
1024	R thoracic	M	16,02	49	No
1014	R thoracic	F	14,97	30	Mother
1261	R thoracic	M	16,12	70	No
1061	R thoracic	M	13,28	75	No
1025	R thoracic	F	15,32	53	No
1063	R thoracic	F	14,81	67	No
1040	R thoracic	F	16,29	60	No
1027	R thoracic	F	16,68	57	Operated sister
1056	R thoracic	F	18,49	34	No
S-1144	R thoracic	F	5,42	53	No
1086	R thoracic	F	11,07	100	No
M-1143	R thoracic	F	16,95	83	No
1319	R thoracic	F	13,73	54	No
1345	R thoracic	F	18,6	32	No
1041	R thoracic	M	15,43	48	No
1266	R thoracic	M	15,56	52	No
S-1322	R thoracic	F	13,11	51	No
1036	R thoracic	F	14,81	67	No
S-1132	R thoracic	F	13,02	48	No
1049	R thoracic	F	14,8	67	No
S-1259	R thoracic	F	14,54	33	No
1104	R thoracic	F	13,7	58	No
1084	R thoracic	F	11,97	70	No
1057	R thoracic	F	15,13	30	No
1066	R thoracic	F	17,33	53	Aunt
1021	R thoracic	F	15,07	57	No
1019	R thoracic	F	12,71	67	Cousin and aunt
1126	R thoracic	F	15	55	Aunt and mother
1089	R thoracic	F	17,78	84	Aunt
S-1393	R thoracic	F	13	49	No
1082	R thoracic	F	21,95	100	No
1113	R thoracic	F	12,06	67	No
S-1377	R thoracic	F	16,18	58	No
1045	L thoracolumbar	F	19,48	38	No
1002	L thoracolumbar	F	17,96	50	No
1038	L thoracolumbar	F	17,76	47	No
1033	L thoracolumbar	F	16,19	37	Aunt
1155	L thoracolumbar	F	14,44	37	No
1043	R thoracolumbar	F	14,12	50	Father
1007	R thoracolumbar	M	18,67	61	Mother
S-1388	R thoracolumbar	F	14,6	38	No
1375	R thoracolumbar	F	13,71	53	No
1043	R thoracolumbar	F	14,12	50	Father
1058	R/L double scoliosis	F	14,4	nd	No
1037	R/L double scoliosis	F	14,82	41-50	Mother
1064	R/L double scoliosis	F	15,16	90-90	No
1022	R/L double scoliosis	M	17,29	46-30	Cousin
1015	R/L double scoliosis	F	14,82	41-50	Mother
1060	R/L double scoliosis	F	16	38-44	No
1069	R/L double scoliosis	F	12	57-38	No
1047	R/L double scoliosis	F	18,36	23-35	No
1059	R/L double scoliosis	F	14,41	57-65	No
1090	R/L double scoliosis	F	17,97	45-57	Mother and stepsister
1012	R/L double scoliosis	F	11,81	74-56	No
1032	R/L double scoliosis	F	11,44	57-38	No
1011	R/L double scoliosis	F	19,17	45-60	No

(Continued)

TABLE 1. Clinical Variables Associated with AIS Patients Tested (Continued)

Case Number	Curve Pattern	Gender	Age at Surgery (yrs)	Cobb Angle	Heredity
1042	R/L double scoliosis	F	14,24	70-48	Mother and brother
1350	R/L double scoliosis	F	12	41-54	No
1347	R/L double scoliosis	F	18	56-45	No
1389	R/L double scoliosis	F	12	46-66	No
S-1310	R/L double scoliosis	F	15,52	55-42	No
1387	R/L double scoliosis	F	15,01	29-37-35	Mother
1023	R/L double scoliosis	F	18,93	29-35	No
1112	R/L double scoliosis	F	13,26	58-49	Aunt
S-1373	R/L double scoliosis	F	15	37-35	No
1020	R/L double scoliosis	F	12,84	59-57	No
1006	R/L double scoliosis	F	12,65	61-46	No
1136	R/L double scoliosis	F	13,39	72-37	No
1029	R/L double scoliosis	F	14,4	56-53	No
1122	R/L double scoliosis	F	13,41	60-48	No
S-1337	R/L double scoliosis	F	15,61	41-50	No
1053	R/L double scoliosis	F	13,5	48-42	No
1357	R/L double scoliosis	F	15,61	57-50	Brother
1371	R/L double scoliosis	F	15,29	72-59	No
1110	R/L double scoliosis	F	14,62	62-44	Mother
1194	R/L double scoliosis	F	14,34	67-55	Mother
1003	R/L double scoliosis	M	17,17	70-50	No
1372	R/L double scoliosis	F	15,69	63-43-42	Aunt
1083	L lumbar	F	14,06	76	No
1017	L lumbar	M	16,41	45	Cousin and daughter
1107	R lumbar	F	10,43	40	No
1276	L thoracic	F	15,26	42	No
1165	L thoracic	M	14,34	61	No
1276	L thoracic	F	15,26	42	No
1114	ND	F	18,09	ND	No

ND = not determined.

Table 2. Clinical variables associated with control subjects.

Case Number	Diagnosis	Curve Pattern	Gender	Age at Surgery (yrs)	Cobb Angle	Heredity
2700	Trauma	N/A	M	14	N/A	N/A
2750	Trauma	N/A	F	12	N/A	N/A
2775	Trauma	N/A	M	14	N/A	N/A
2791	Trauma	N/A	F	13	N/A	N/A
1046	Marfan	L thoracolumbar	F	19	38	No
1054	Kyphosis	R thoracic	F	14	63	Uncle
S-1141	Kyphosis	R thoracic	M	14,2	58	No
1034	Kyphosis	R thoracic	F	17,75	40	No
1001	Noonan	R thoracic	F	18,78	49	No
1010	NF/scoliosis	R thoracolumbar	F	15,77	115	No
1009	DMD	—	M	14,02	—	No
1031	Spondylolisthesis	R/L double scoliosis	M	14,52	57–38	No
1062	Spondylolisthesis	R lumbar	F	16,45	—	No
1035	Spondylolisthesis	L lumbar	F	19,02	—	No

DMD = Duchenne Muscular Dystrophy.

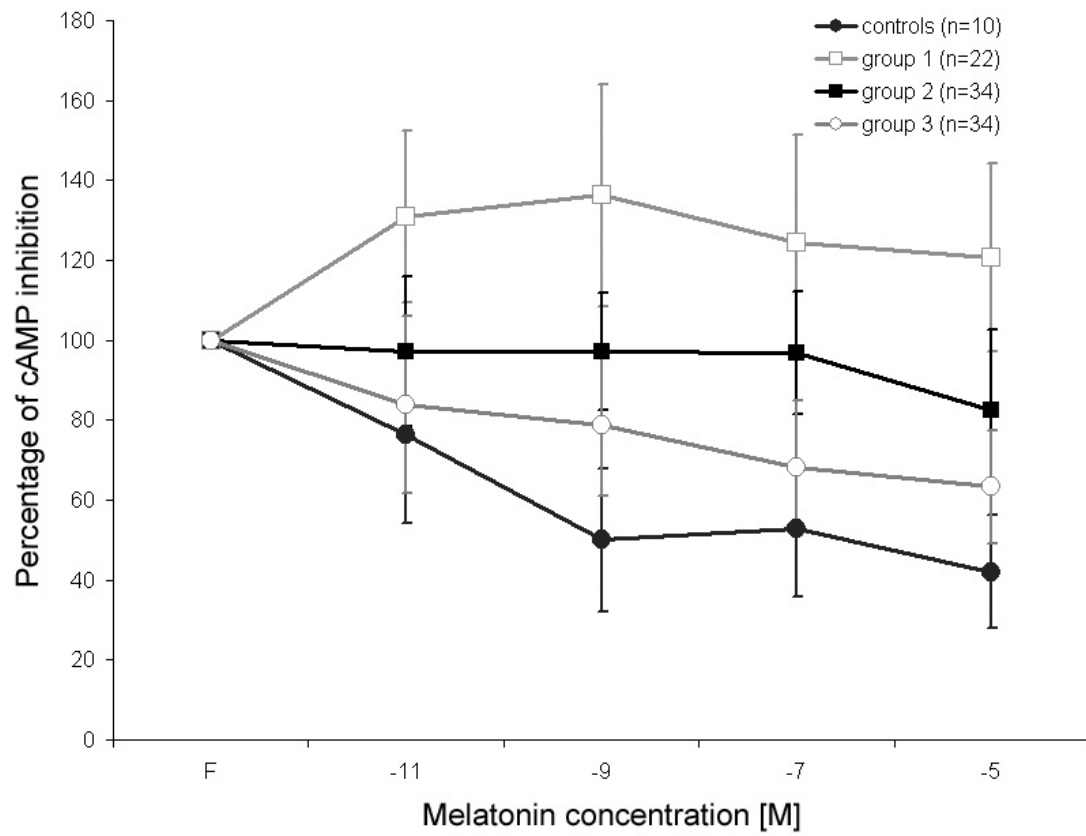


Figure 1.

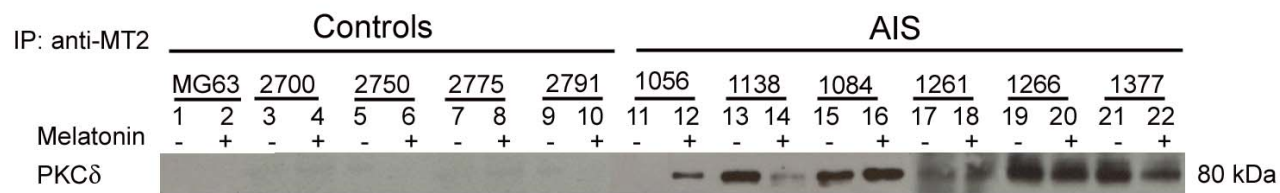


Figure 2.

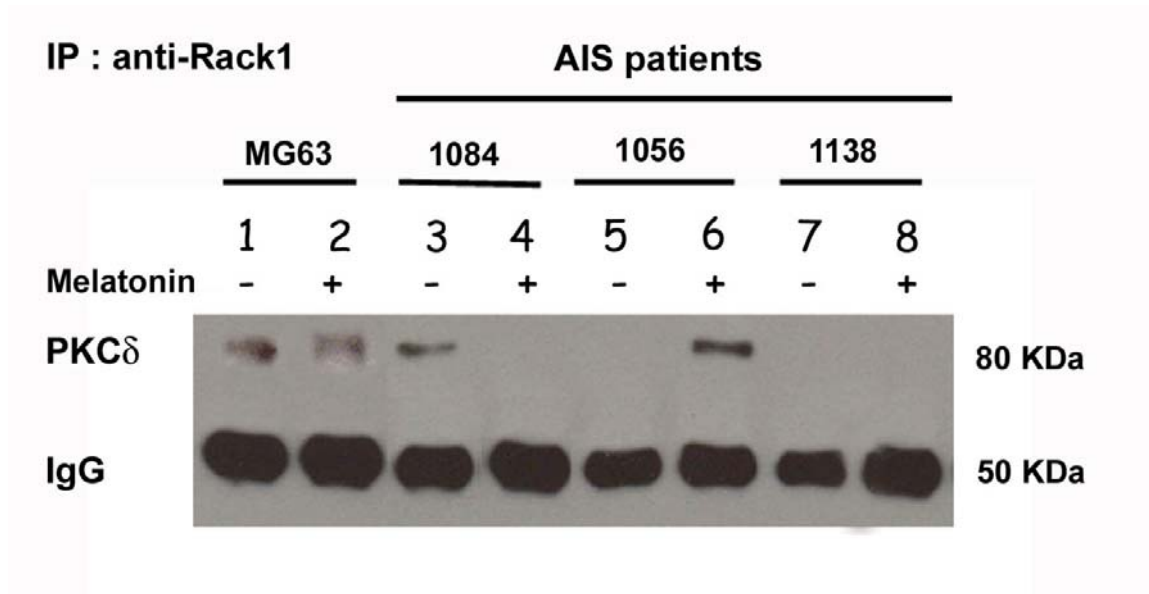


Figure 3.

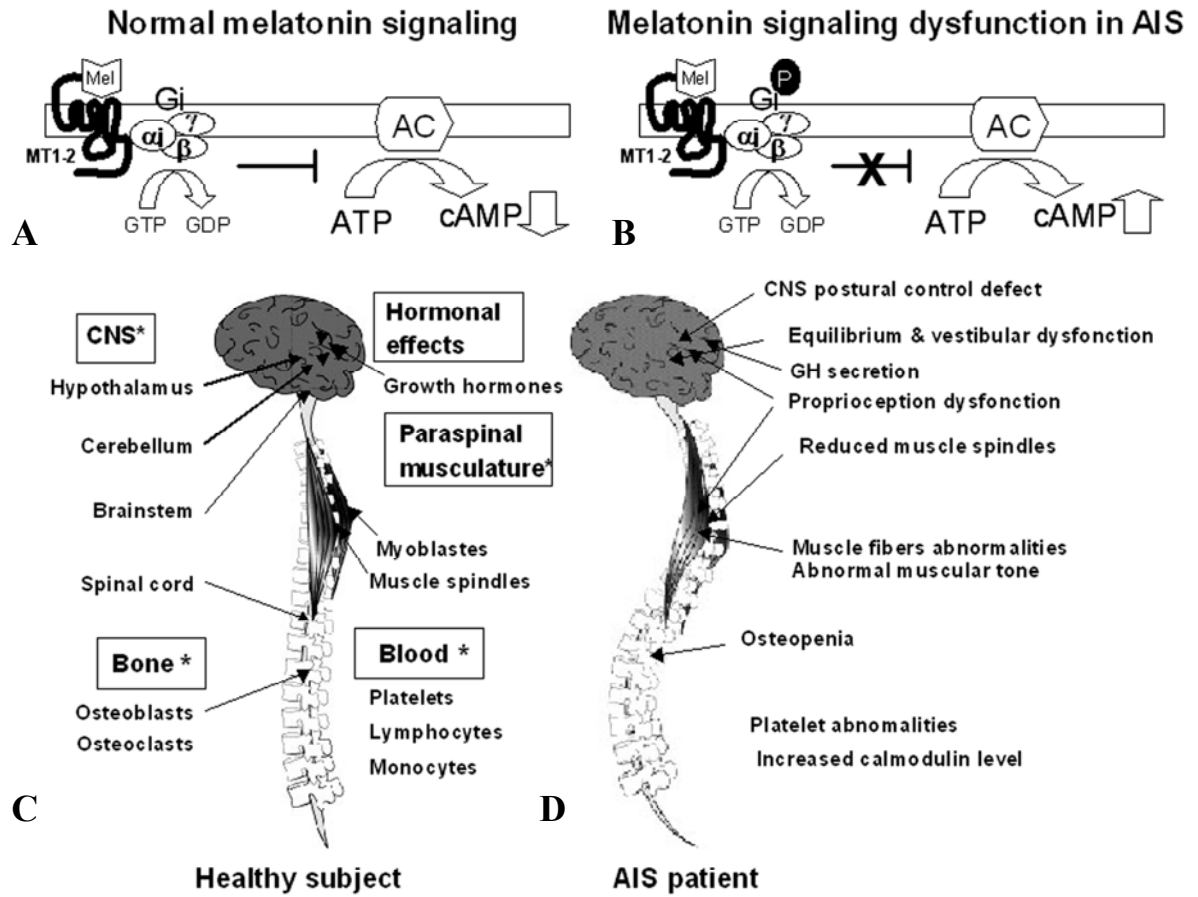


Figure 4.

Rôle de l'ostéopontine dans la SIA.

Introduction

Malgré que la scoliose soit une maladie décrite il y a plusieurs siècles, son étiologie demeure encore obscure. En 1958 Thillard a découvert que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet induit une scoliose suite à une carence en mélatonine (Thillard 1959). L'implication de la mélatonine dans l'étiologie de la maladie chez l'humain était controversée vu que la plupart des études n'ont pu montrer de carence de cette hormone chez les patients scoliotiques. Nos travaux ont mis fin à cette controverse en mettant en évidence un défaut de signalisation de la mélatonine chez tous les patients scoliotiques analysés. C'est-à-dire que même si la mélatonine est présente, elle n'arrive pas à transmettre correctement son signal. Par la suite, nous nous sommes intéressés à identifier les facteurs en aval de la signalisation de la mélatonine qui peuvent jouer un rôle important dans l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Parmi plusieurs gènes candidats, nous avons identifié l'OPN compte tenu qu'elle est à la fois régulée par la mélatonine et surtout qu'elle joue un rôle important dans les systèmes affectés chez les patients SIA tels que le SNC, la proprioception et le système vestibulaire. Nous avons utilisé différentes approches pour arriver à la même conclusion que l'OPN est essentielle pour l'initiation et la progression de la scoliose chez le poulet pinéaléctomisé, les souris bipèdes et surtout chez l'humain.

**Quatrième publication: High Circulating Levels of
Osteopontin Are Associated with Idiopathic Scoliosis
Onset and Spinal Deformity Progression**

Article soumis au New England Journal of Medicine, mai 2009

Ma participation dans cet article :

Ma participation dans la réalisation de cet article est la suivant : J'ai participé à la planification des expériences de cet article, je me suis occupé de toute l'expérimentation avec les souris incluant la réalisation de chirurgies pour générer des souris bipèdes. D'un autre côté j'ai écrit la première version de cet article et aidé à la conception des figures.

High Circulating Levels of Osteopontin Are Associated with Idiopathic Scoliosis Onset and Spinal Deformity Progression

Bouziane Azeddine, M.Sc., Anita Franco, M.Sc. Pierre H. Rompré, M.Sc., Marie-Hélène Roy-Gagnon, Ph.D., Isabelle Turgeon, B.Sc., Sacha Blain, B.Sc., Dashen Wang, M.D., Ph.D., Keith M. Bagnall, Ph.D., Benoît Poitras, M.D, Hubert Labelle, M.D., Charles-Hilaire Rivard, M.D., Guy Grimard, M.D., Jean Ouellet, M.D., Stefan Parent M.D., Ph.D. and Alain Moreau, Ph.D.

These authors (B.A. and A. F.) should be considered co-first authors. From the Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Université de Montréal, Montreal (B.A., A.F., M.-H. R.-G., I.T., S.B., D.W., A.M); Department of Surgery, University of Alberta, Edmonton (K.M.B.); Orthopedic Division, Sainte-Justine University Hospital and Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal (B.P., H.L., C-H. R., G.G., S.P.); Orthopedic Division, The Montreal Children's Hospital, McGill University, Montreal (J.O.); Department of Stomatology, Faculty of Dentistry (P.H.R., A.M.); Department of Biochemistry, Faculty of Medicine (A.M.) Université de Montréal, Montreal. Address reprint requests to Dr. Alain Moreau at the Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Room 4734, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Côte-Sainte-Catherine Road, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

ABSTRACT

BACKGROUND

We investigated the involvement of osteopontin (OPN), a multifunctional cytokine, in idiopathic scoliosis (IS), the most common form of scoliosis and deformity in pediatrics.

METHODS

A group of 320 consecutive patients with IS were compared with 120 healthy control subjects and 82 asymptomatic offspring, born from at least one scoliotic parent, who are considered at-risk of developing this disorder. Plasma OPN and soluble CD44 receptor (sCD44) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. Contributions of OPN and CD44 receptors to idiopathic scoliosis were validated using C57Bl/6 mice, a well known scoliosis animal model.

RESULTS

Mean plasma OPN levels were significantly increased in IS patients and correlated with disease severity, with average values of 743 ± 326 and 975 ± 389 nanograms per milliliter for moderate ($10\text{--}44^\circ$) and severe ($\geq 45^\circ$) spinal deformities, respectively, when compared to the healthy control group (568 ± 216 nanograms per milliliter). Elevated plasma OPN levels were also found in the asymptomatic at-risk group (871 ± 387 nanograms per milliliter), suggesting that these changes precede scoliosis onset. Mean plasma sCD44 levels were significantly lower only in IS patients with Cobb angle $\geq 45^\circ$ compared to healthy control subjects. All transgenic C57Bl/6 mice devoid of OPN or CD44 receptor were protected against scoliosis, contrasting with wild-type ones.

CONCLUSIONS

High circulating OPN and low sCD44 levels herald scoliosis formation in idiopathic scoliosis and might be useful biomarkers in the prediction of scoliosis in pediatric populations. In addition, animal studies demonstrated that OPN interactions with CD44 receptors are required to trigger scoliosis.

Introduction

The etiology of idiopathic scoliosis (IS), the most common form of scoliosis, remains poorly understood. This results in the traditional paradigm that IS is a multifactorial disease with a genetic predisposition.¹⁻⁷ Our team previously demonstrated the occurrence of a melatonin signaling dysfunction in cells derived from biopsies obtained intraoperatively from affected IS patients.⁸ Since pinealectomized chickens, rats and bipedal C57Bl/6 mice (a natural melatonin-deficient mouse strain) also develop scoliosis, we hypothesized that scoliosis development in IS patients and different melatonin-deficient animal models could be induced by a similar mechanism involving a common downstream effector regulated by melatonin. Among the possible candidates regulated by melatonin, we investigated the implication of Osteopontin (OPN) in AIS pathomechanism.

OPN (also called secreted phosphoprotein-1, minopontin, or Eta-1) is a phosphorylated glycoprotein containing an arginine-glycine-aspartate (RGD) sequence present in mineralized tissues such as extracellular matrices. This multifunctional cytokine is involved in many adult pathological conditions.^{9;10} The presence of OPN transcript and protein in postural control centers such as the cerebellum, skeletal muscle proprioceptive sensory organs, and inner ear structures that control equilibrium¹¹ is of interest, since IS patients also happen to exhibit defects in postural control, proprioception and equilibrium.^{12;13} The OPN signaling pathways are not well understood, although it is known that aside from interacting with integrins, OPN can interact with CD44 receptors at the cell surface.^{14;15} The soluble variant isoforms of CD44 (sCD44) have been associated with several pathological conditions.¹⁶⁻¹⁹ It has been proposed that sCD44 isoforms are either

generated through proteolytic cleavage of cell surface CD44 or by *de novo* synthesis due to alternative splicing. This study was undertaken to assess the relationship between plasma OPN and sCD44 levels with the initiation and curve progression of IS in humans. Further characterization of the mechanism by which OPN could trigger scoliosis was done by investigating bipedal C57Bl/6 mice, a well known scoliosis animal model, and transgenic ones in the same genomic background characterized by the absence of OPN or CD44 receptor due to genetic modification.

METHODS

Study populations

The institutional review boards of Sainte-Justine Hospital, Montreal Children's Hospital, Shriners Hospital for Children in Montreal, The Affluent School Board, and The Montreal English School Board approved the study. Parents or legal guardians of all participants gave informed written consent, and minors also gave their assent. All subjects were examined by one of six orthopedic surgeons (H.L., B.P., C-H.R., G.G., J.O., S.P.) associated with this study (Table 1). A person was deemed to be affected if history and physical examination were consistent with the diagnosis of idiopathic scoliosis and a minimum of a ten degree curvature in the coronal plane with vertebral rotation was found on radiograph. Healthy controls were recruited in elementary and high schools in Montreal. Each subject was examined by the same orthopedic surgeon (B.P.) using Adam's forward bending-test with a scoliometer. Asymptomatic at-risk children were recruited and examined (B.P. and C-H. R.) in our special early screening clinic at Sainte-Justine Hospital.

Osteopontin and sCD44 enzyme-linked immunosorbent assays

Peripheral blood samples from IS patients, asymptomatic at-risk children and healthy control subjects were obtained to determine plasma levels of OPN. These were collected in EDTA-treated tubes and then centrifuged. Derived plasma samples were aliquoted and kept frozen at -80°C until thawed and analyzed. Plasma concentrations of OPN and sCD44std (standard isoform) were measured by capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to protocols provided by the manufacturer (IBL, Hamburg, Germany). The OPN ELISA kit measures total concentration of both

phosphorylated and non-phosphorylated forms of OPN in plasma whereas the sCD44std ELISA kit detects all circulating CD44 isoforms. Assay reproducibility was evaluated by calculating intra and inter-assay coefficient of variation. For OPN ELISA kits the intra-assay coefficient of variation was 8% and the inter-assay coefficient of variation was 4.7%. For sCD44 ELISA kit, the intra-assay coefficient of variation was 4.8% and the inter-assay coefficient of variation was 4.1%. All ELISA tests were performed in duplicate and the optical density was measured at 450 nm using an AsysHiTech Expert-96 microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK).

Generation of bipedal C57Bl/6 OPN-null and CD44-null mice

Breeding pairs of C57Bl/6 mice devoid of either OPN (OPN-null mice) or CD44 receptors (CD44-null mice) were obtained from Dr. Susan Rittling (Rutger University, NJ, USA) and Dr. Tak Mak (University of Toronto, ON, Canada) respectively to establish our own colonies, while C57Bl/6 mice were used as wild-type control mice (Charles-River, Wilmington, MA, USA). C57Bl/6 mouse strain was used because these mice are naturally deficient in melatonin²⁰ and exhibit high levels of circulating OPN.²¹ These mice develop scoliosis when they are maintained in a bipedal state.²² Bipedal surgeries were performed after weaning (5-weeks after birth) by amputation of the forelimbs and tail under anesthesia as reported previously.²² All mice underwent complete radiographic examination under anesthesia using a Faxitron X-rays apparatus (Faxitron X-rays Corp. Wheeling, IL, USA) every two weeks starting at the age of six weeks. Anteroposterior X-rays were taken and each digital image was subsequently evaluated for the presence of scoliosis. A threshold value of 10° or higher of Cobb's angle was used to identify a significant scoliotic condition.

Statistical analysis

Age and gender differences were assessed using Student's *t* and Pearson's Chi-square tests, respectively among the IS patient, at-risk control, and healthy control groups. We used linear regression models to compare OPN and sCD44 levels in the two IS patient groups and the at-risk group against to those in the healthy control group, adjusting for age and gender. We then used multinomial logistic regression to estimate the log odds of IS and at-risk status compared with control status while adjusting for age and gender. In order to investigate the ability of OPN and sCD44 to distinguish IS patients with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ from control subjects, we used receiver-operating characteristics (ROC) curves, profiling the sensitivity and specificity of logistic regression models with or without OPN and sCD44 levels. The C statistic, measuring the area under the ROC curve (AUC), and associated 95% confidence interval were calculated. Statistical analysis was performed with SAS software, version 9.1. The ROC SAS macro and the ROCR package for R (www.r-project.org)²³ were used for the ROC analysis. A two-sided *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study populations

Between January 2006 and June 2008, we investigated three populations: a group of 320 consecutive patients with IS, 120 healthy control subjects without any family antecedent for scoliosis and 82 asymptomatic offspring, born from at least one scoliotic parent, who are considered at risk of developing a scoliosis. All subjects were Caucasians and demographic characteristics of IS patients are shown in Table 1. Patients with IS were divided into two subgroups according to their spinal curve severity (Cobb's angle between 10° - 44° vs. $\geq 45^{\circ}$). In the most severely affected IS subgroup, all the tests were performed pre-operatively and none of the patients wore a brace in the last six months preceding the test. There was a greater proportion of girls in the IS groups (84% in both 10 - 44° and $\geq 45^{\circ}$ subgroups), compared to the control groups (53% and 65% in healthy and at-risk control groups, respectively, $P > 0.0001$ when comparing IS to control groups). There was no significant gender difference between the two IS subgroups ($P = 0.76$) or between the control and at-risk groups ($P = 0.32$). Mean age was significantly higher in IS patients with Cobb's angle $\geq 45^{\circ}$ compared to those with 10 - 44° angle (15.4 ± 1.7 years vs. 14.0 ± 2.0 years, $P < 0.0001$). Both IS groups had a higher mean age compared to control groups (12.7 ± 2.2 years for the healthy group and 10.0 ± 3.6 years for the at-risk group, $P < 0.0001$ when comparing to either IS group).

Plasma OPN and sCD44 levels are associated with Idiopathic Scoliosis

Plasma OPN and sCD44 levels by IS status and gender are shown in Table 2. Mean plasma OPN levels were significantly higher in the two IS groups and in the at-risk asymptomatic group compared to the healthy control group ($P<0.0001$ after adjustment for age and gender). Mean plasma sCD44 levels were significantly lower in IS subjects with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ compared to healthy control subjects ($P=0.01$ after adjustment for age and gender). Also shown in Table 2 are the results from the multinomial logistic regression analysis. In IS patients, plasma OPN levels were significantly correlated with the severity of spinal deformities (Cobb's angle) after adjusting for age (partial Pearson correlation coefficient adjusted for age=0.35, $P\leq 0.01$, Figure 1A), whereas plasma sCD44 levels were not significantly correlated with Cobb's angle (partial Pearson correlation coefficient adjusted for age of -0.09, $P=0.11$). We found that an increase of 100 nanograms per milliliter in OPN levels was associated with an almost two-fold increase in the odds of IS with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ ($P<0.0001$), while the same increase in sCD44 levels was associated with reduced odds of IS with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ (Odds ratio=0.72, $P=0.01$). The odds of IS with Cobb's angle between $10-44^\circ$ and those of being at-risk of developing IS also increased as OPN levels increased (Odds ratio=1.4, $P<0.0001$).

To investigate the ability of OPN and sCD44 to differentiate IS patients with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ from control subjects, we performed ROC curve analysis for two logistic regression models predicting IS with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ (compared to control subjects) (Figure 1B). A model including age, gender, OPN, and sCD44 yielded an AUC of 96.5 (95% CI, 94.4 to 98.7), which was significantly greater than that for the model including

only age and gender (AUC = 85.5; 95% CI, 80.0 to 90.1; $P < 0.0001$). The box-plots in Figure 1C and 1D show the plasma concentrations of OPN and sCD44 respectively in the different study groups.

OPN signaling in Idiopathic Scoliosis

In order to further validate the critical role of OPN in the formation of scoliosis, recourse to an animal model was necessary since this cannot be addressed directly in humans. We used bipedal C57Bl/6 mice since this mouse strain is naturally deficient in melatonin and prone to developing scoliosis after bipedal ambulation for 8 weeks with a higher rate in females (46 percent) than males (24 percent), which is analogous to what is seen in humans (Table 3). Moreover, bipedal females exhibited more severe spinal deformities than males. Availability of genetically modified C57Bl/6 mice allowed us to demonstrate that bipedal mice devoid of either OPN or CD44 receptor were protected against scoliosis development and thus provides a compelling argument that scoliosis formation and curve progression proceed through OPN-CD44 signaling.

DISCUSSION

Although IS is a disease affecting a large number of young children and adolescents (0.2%-6% of the whole population), its etiology remains unclear.^{24;25} Moreover, there is no proven method or test available to identify children or adolescents at risk of developing IS or even to identify which of the affected individuals may require treatment due to the risk of progression. Consequently, the application of current treatments, such as bracing or surgical correction, is delayed until a significant deformity is detected or until a significant progression is clearly demonstrated, resulting in a late and less than optimal treatment.²⁶ In this context, by studying familial and sporadic IS cases (the latter describing the origin of the majority of IS cases), our clinical data defined an unrecognized and crucial role for OPN in the initiation and progression of spinal deformity in IS.

Diagnostic value of plasma Osteopontin and sCD44 in Idiopathic Scoliosis

In this cross-sectional study, we have shown that elevation of plasma OPN levels correlates with disease stage as plasma levels were higher in patients with the most severe spinal deformities. When we corrected for age and gender, we found that an increase of 100 nanograms per milliliter in OPN levels was associated with an almost two-fold increase in the odds of presenting a severe scoliosis. Elevated plasma OPN levels were also found in the asymptomatic at-risk group (871 ± 387 nanograms per milliliter), suggesting that these changes precede scoliosis onset, rather than present as a consequence of this condition. These results are in agreement with previous reports showing that the offspring of at least one affected parent develop a scoliosis more often than children born from unaffected parents.^{27;28} Despite the fact that elevated plasma OPN levels have been found in some

adult cancers and inflammatory conditions,²⁹⁻³² high plasma OPN levels are not normally associated with other pediatric diseases and seem specific to idiopathic scoliosis in this context.

Contribution of sCD44 as a potential disease-modifying factor?

Plasma levels of sCD44 were investigated because it can act as a decoy receptor for OPN. Multinomial logistic regression analysis showed that an increase of 100 nanograms per milliliter in sCD44 levels was associated with a protective effect, reducing by 1.4 fold the odds of having a severe scoliosis. Decreased plasma sCD44 levels have been found in immunodeficiency and autoimmune diseases³³⁻³⁵ but none of these conditions normally lead to scoliosis.

Does idiopathic Scoliosis onset is induced by OPN-CD44 signal transduction?

To acquire further insights regarding the mechanism by which OPN acts to induce scoliosis we studied scoliosis development in bipedal C57Bl/6 mice and in bipedal C57Bl/6 knocked-out mice for OPN or CD44 (Table 3). Indeed, inactivation of either the *ssp1* gene encoding for OPN or the CD44 gene in transgenic C57Bl/6 mice completely prevented the development of scoliosis, providing a genetic demonstration that scoliosis formation proceeds through OPN-CD44 signaling (Table 3). Therefore, it is most likely that the same mechanism occurs in idiopathic scoliosis, although the nature of genetic and environmental factors promoting OPN up-regulation in humans remains to be determined. To the same extent, exactly where OPN signaling primarily acts to trigger scoliosis remains to be

elucidated, since this circulating cytokine can act at a distance and CD44 receptors are ubiquitously expressed.

In summary, our clinical data and experiments on animals demonstrate that OPN is essential to induce scoliosis formation and curve progression through interactions with CD44 receptors, thus offering a first molecular concept to explain the pathomechanism leading to the asymmetrical growth of the spine in idiopathic scoliosis. At the clinical level, monitoring of plasma OPN and sCD44 levels could be useful in predicting the risk of developing a scoliosis and subsequent curve progression by establishing specific disease trajectories for children and adolescents. A limitation of this study is that we have not yet shown that OPN and sCD44 have predictive value in humans since we are presenting cross-sectional results. Prospective studies will be required to validate the usefulness of these biomarkers for prognostic purposes to predict progression in the imminent onset of IS in asymptomatic children and severity of curve IS patients at an earlier stage.

Supported by grants from La Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France, Paris, France (to Dr. Moreau and Dr. Labelle) and from Paradigm Spine, New York, USA (to Dr. Moreau). Mr. Azeddine is supported by a Canadian Institute of Health Research/MENTOR training program PhD Scholarship. Dr. Moreau reports having received lecture fees from Paradigm Spine and served on the scientific advisory board of Paradigm Spine. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported. We are indebted to the subjects and families who participated in this study. We also thank Dr. Susan Rittling (Rutger University, NJ, USA) and Dr. Tak Mak (University of Toronto, ON, Canada) for the C57Bl/6 OPN-null and CD44-null mice; to Ginette Lacroix for coordinating the study and Ginette Larouche and the nursing teams at Sainte-Justine University Hospital, Montreal's Children Hospital, and Shriners Hospital for Children in Montreal for their support.

Legends for Figures

Figure 1. Relationship between plasma osteopontin levels and Cobb's angle in patients affected with IS. In Panel A, the slope shows the association between OPN levels and Cobb's angle adjusted for age in IS subjects. Age and OPN levels explained 25% of the variation of Cobb's angle. Panel B shows ROC curves for IS with Cobb's angle $\geq 45^\circ$. The curves are based on logistic regression models of the odds of IS with Cobb's angle $\geq 45^\circ$ compared to healthy controls, including covariates (age and gender) only (green) or covariates and OPN and sCD44 levels (blue). Adding the biomarkers significantly increased the area under the ROC curve (96.5 vs. 85.5, $P < 0.0001$). The box-plots in panels C and D show the plasma concentrations of OPN and sCD44 respectively in the different study groups.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with IS, healthy control and at risk control subjects.

Subjects	Characteristics							
	Mean Age (Years)	Single Scoliosis Cobb Angle (°)			Double Scoliosis Cobb Angle (°)			Triple Scoliosis Cobb Angle (°)
		Thoracic	Lumbar	Thoracolumbar	Thoracic + Thoracic	Thoracic + Lumbar	Thoracic + Thoracolumbar	
All IS patients (N=320)	14.2 ± 2.1	36 ± 20	24 ± 8	21 ± 15	29 ± 6 16 ± 4	36 ± 20 32 ± 19	24 ± 12 24 ± 13	32 ± 16 40 ± 23 30 ± 11
		N = 68	N = 11	N = 119	N = 2	N = 64	N = 47	N = 9
IS Females only (N=268)	14.2 ± 2.0	37 ± 19	24 ± 9	21 ± 14	29 ± 6 16 ± 4	36 ± 19 33 ± 19	24 ± 11 24 ± 12	35 ± 16 43 ± 23 33 ± 9
		N=54	N = 9	N = 99	N = 2	N = 56	N = 41	N = 7
IS Males only (N=52)	14.6 ± 2.2	30 ± 21	24 ± 0	21 ± 19	-	35 ± 25 29 ± 22	29 ± 19 29 ± 21	19 ± 16 28 ± 24 18 ± 10
		N = 14	N = 2	N = 20	-	N = 8	N = 6	N = 2
All healthy control subjects (N=120)	12.7 ± 2.2	-	-	-	-	-	-	-
Female healthy control subjects only (N=63)	12.8 ± 2.2	-	-	-	-	-	-	-
Male healthy control subjects only (N=57)	12.6 ± 2.2	-	-	-	-	-	-	-
All at-risk control subjects (N=82)	10.0 ± 3.6	-	-	-	-	-	-	-
Female at-risk control subjects only (N=53)	10.1 ± 3.8	-	-	-	-	-	-	-
Male at-risk control subjects only (N=29)	9.8 ± 3.2	-	-	-	-	-	-	-

* Plus-minus values are means ± standard deviations.

† Mean Cobb angles for double and triple scoliosis are represented by the curvatures on the respective levels separately, whether they are thoracic, lumbar and/or cervical.

Table 2. Association between the plasma levels of OPN and sCD44 and IS.

Table 1. Characteristics of the study population											
Females				Males			All subjects				
Subject Group	N	Mean biomarker level (ng/ml)	Range	N	Mean biomarker level (ng/ml)	Range	N	Mean biomarker level (ng/ml)	Range	Odds Ratio per 100 ng/ml increase in biomarker level (95% CI)§	P value§
OPN											
Healthy controls	63	543 ± 197	243–1001	57	596 ± 233	259–1228	120	568 ± 216	243–1228		
At risk controls	53	856 ± 404	208–1834	29	898± 360	391–1629	82	871 ± 387†	208–1834	1.44 (1.27–1.63)	< 0.0001
IS < 45°	216	715 ± 290	206–1592	42	883 ± 351	197–1668	258	743 ± 306†	197–1668	1.43 (1.29–1.60)	< 0.0001
IS ≥ 45°	52	924 ± 367	201–1821	10	1238 ± 409	575–1872	62	975 ± 389†	201–1872	1.90 (1.65–2.19)	< 0.0001
sCD44											
Healthy controls	63	504 ± 97	272–829	57	537 ± 94	299–800	120	519 ± 97	272–829		
At risk controls	53	506 ± 95	316–760	29	530 ± 117	304–848	82	515 ± 103	304–848	0.81 (0.62–1.06)	0.13
IS < 45°	216	487 ± 151	194–1253	42	501 ± 107	288–793	258	489 ± 145	194–1253	0.88 (0.73–1.06)	0.18
IS ≥ 45°	52	441 ± 243	49–882	10	402 ± 216	147–962	62	434 ± 238‡	49–962	0.72 (0.56–0.94)	0.014

* Plus-minus values are means ± standard deviations

† P value < 0.0001 for the comparison with the healthy control group using linear regression analysis and adjusting for age and gender

‡ P value < 0.05 for the comparison with the healthy control group using linear regression analysis and adjusting for age and gender

§ Odds Ratio and P values are for the comparison with the healthy control group from a multinomial logistic regression model including both biomarkers, age, and gender.

Table 3. Frequency of scoliosis in bipedal C57Bl/6 mice and genetically modified mice devoid of OPN or CD44.

Mouse Strain	Characteristic			
	Gender	N	% of scoliosis	Mean period of follow-up (weeks)
C57Bl/6				
	Male	21	24	57 ± 3
	Female	28	46	57 ± 3
C57Bl/6 OPN-null				
	Male	30	0	54 ± 2
	Female	24	0	54 ± 2
C57Bl/6 CD44-null				
	Male	29	0	52 ± 2
	Female	31	0	52 ± 2

* Plus-minus values are means ± standard deviations

Note that none of the genetically modified mice developed a scoliosis even after 52 weeks, while scoliosis occurs in bipedal C57Bl/6 after only 8 weeks post-surgery.

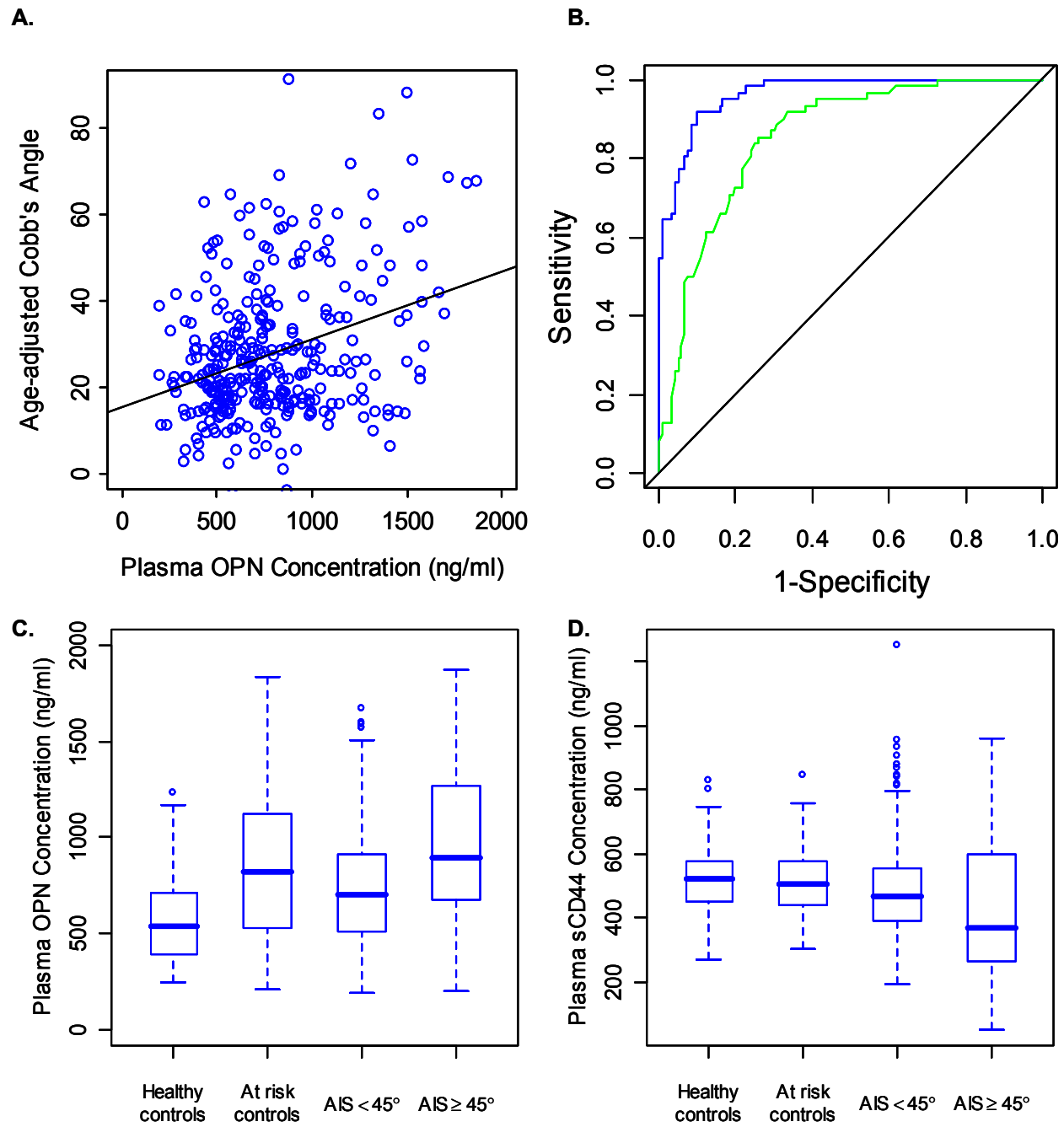


Figure 1.

Reference List

1. Brodner W, Krepler P, Nicolakis M et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(3):399-403.
2. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A(8):1157-1168.
3. Veldhuizen AG, Wever DJ, Webb PJ. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur Spine J* 2000; 9(3):178-184.
4. Miller NH. Cause and natural history of adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Clin North Am* 1999; 30(3):343-52, vii.
5. Miller NH. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin Orthop* 2002;(401):60-64.
6. Miller NH, Schwab DL, Sponseller PD, Manolio TA, Pugh EW, Wilson AP. Characterization of idiopathic scoliosis in a clinically well-defined population. *Clin Orthop* 2001;(392):349-357.
7. Wise CA, Barnes R, Gillum J, Herring JA, Bowcock AM, Lovett M. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25(18):2372-2380.
8. Moreau A, Wang DS, Forget S et al. Melatonin Signaling Dysfunction in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine* 2004; 29:1772-1781.
9. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107(9):1055-1061.
10. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM* 2002; 95(1):3-13.

11. Lopez CA, Olson ES, Adams JC, Mou K, Denhardt DT, Davis RL. Osteopontin expression detected in adult cochleae and inner ear fluids. *Hear Res* 1995; 85(1-2):210-222.
12. Simoneau M, Richer N, Mercier P, Allard P, Teasdale N. Sensory deprivation and balance control in idiopathic scoliosis adolescent. *Exp Brain Res* 2006; 170(4):576-582.
13. Guo X, Chau WW, Hui-Chan CW, Cheung CS, Tsang WW, Cheng JC. Balance control in adolescents with idiopathic scoliosis and disturbed somatosensory function. *Spine* 2006; 31(14):E437-E440.
14. Weber B, Rosel M, Arch R, Moller P, Zoller M. Transient expression of CD44 variant isoforms in the ontogeny of the rat: ectoderm-, endoderm- and mesoderm-derived cells express different exon combinations. *Differentiation* 1996; 60(1):17-29.
15. Panda D, Kundu GC, Lee BI et al. Potential roles of osteopontin and α V β 3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(17):9308-9313.
16. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992; 116(3):817-825.
17. Komura K, Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Elevated levels of circulating CD44 in patients with systemic sclerosis: association with a milder subset. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41(10):1149-1154.
18. Ruiz P, Schwarzler C, Gunthert U. CD44 isoforms during differentiation and development. *Bioessays* 1995; 17(1):17-24.

19. Scott DA, Stapleton JA, Palmer RM et al. Plasma concentrations of reputed tumor-associated soluble CD44 isoforms (v5 and v6) in smokers are dose related and decline on smoking cessation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(11):1211-1214.
20. von Gall C, Lewy A, Schomerus C et al. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 2000; 12(3):964-972.
21. Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM et al. A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathol* 2004; 164(4):1379-1387.
22. Machida M, Dubousset J, Yamada T et al. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6 mice without pinealectomy. *J Pineal Res* 2006; 41(1):1-7.
23. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCR: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* 2005; 21:3940-3941.
24. Connor JM, Conner AN, Connor RA, Tolmie JL, Yeung B, Goudie D. Genetic aspects of early childhood scoliosis. *Am J Med Genet* 1987; 27(2):419-424.
25. Machida M. Cause of idiopathic scoliosis. *Spine* 1999; 24(24):2576-2583.
26. Scoliosis Research Society. Morbidity & Mortality Committee annual report 1997.
27. Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone Joint Surg Br* 1968; 50(1):24-30.
28. De George FV, Fisher RL. Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects. *J Med Genet* 1967; 4(4):251-257.

29. Mishima R, Takeshima F, Sawai T et al. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(2):167-172.
30. Ang C, Chambers AF, Tuck AB, Winkquist E, Izawa JJ. Plasma osteopontin levels are predictive of disease stage in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2005; 96(6):803-805.
31. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(5):602-606.
32. Kim J, Ki SS, Lee SD et al. Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(9):2051-2059.
33. Lein M, Jung K, Weiss S, Schnorr D, Loening SA. Soluble CD44 variants in the serum of patients with urological malignancies. *Oncology* 1997; 54(3):226-230.
34. Karjalainen JM, Tammi RH, Tammi MI et al. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 2000; 157(3):957-965.
35. Schlosser W, Gansauge F, Schlosser S, Gansauge S, Beger HG. Low serum levels of CD44, CD44v6, and neopterin indicate immune dysfunction in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23(4):335-340.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Bien que la scoliose idiopathique de l'adolescent soit la déformation rachidienne la plus fréquemment rencontrée par les orthopédistes, il était jusqu'à présent impossible de décrire exactement les processus menant à son développement. Les résultats présentés dans cette thèse apportent un nouvel éclairage dans notre compréhension de l'étiopathogénèse de la SIA. Il est généralement accepté que cette maladie soit en fait un regroupement de causes hétérogènes et que différentes mutations dans divers gènes pourraient mener aux déformations rachidiennes observées chez les patients SIA. Cette idée est appuyée par l'existence d'au moins trois types de réponses dans les tests fonctionnels (AMPc et SCD) réalisés dans le cadre de cette thèse avec des cellules isolées de patients SIA. D'un autre côté, cette possibilité est d'autant plus plausible compte tenu de la découverte de plusieurs loci de susceptibilité pour la SIA, ce qui tend à supporter l'implication possible de plusieurs gènes dans cette condition pathologique.

Confirmation du défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA

Afin d'étudier la voie de signalisation de la mélatonine, nous avons utilisé des ostéoblastes isolés à partir de fragments d'os prélevés lors de chirurgies correctives des déformations rachidiennes. Le choix des ostéoblastes repose sur le fait que ce sont des cellules qui répondent à la mélatonine (Roth & coll. 1999) et que l'os est l'un des tissus affectés chez les patients SIA vu que ces derniers sont souvent ostéopéniques (Cheng & coll. 2006). De plus, l'os est un tissu facilement accessible lors des chirurgies correctives

du rachis, ce qui nous a permis de bâtir une biobanque unique au monde constituée de différents types cellulaires (ostéoblastes, myoblastes et lymphocytes) dérivées de plus de 450 patients SIA.

La voie de signalisation de la mélatonine a été analysée en utilisant un test fonctionnel simple qui consiste à traiter les cellules avec la forskoline pour induire la synthèse de l'AMPc suivi d'une mesure de l'effet de doses croissantes de mélatonine sur les concentrations intracellulaires d'AMPc. Ce test nous a permis de mettre en évidence un défaut de signalisation de la mélatonine chez tous les patients SIA analysés soit 41 patients en 2004 (Moreau & coll. 2004) et 90 patients en 2007 (Azeddine & coll. 2007). Cette classification fonctionnelle a permis de diviser ces patients en trois groupes fonctionnels (Moreau & coll. 2004, Azeddine & coll. 2007). Les ostéoblastes des patients du groupe 1 montrent une réponse atypique puisqu'en présence de doses croissantes de mélatonine les niveaux intracellulaires d'AMPc sont augmentés. Dans le deuxième groupe, les ostéoblastes des patients scoliotiques ne répondent pas au traitement à la mélatonine, même à des doses pharmacologiques (10^{-7}M) ou suprapharmacologiques (10^{-5}M). Le troisième groupe quant à lui regroupe des patients dont les ostéoblastes répondent partiellement au traitement à la mélatonine, mais n'atteignent pas les niveaux observés chez les ostéoblastes isolés de sujet témoins non-scoliotiques. L'analyse des variables cliniques (âge, sexe, type de courbure, angle de Cobb) n'a montré aucune différence significative entre les différents groupes.

L'AMPc est un second messager très volatile et régulé par une multitude de voies de signalisation, ce qui diminue la sensibilité du test d'AMPc standard bien qu'il soit utilisé dans la majorité des études comme test mesurant la fonctionnalité de la signalisation via les protéines Gi ou Gs. Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de notre test, nous avons pris avantage de l'avènement d'une nouvelle technologie qu'est la spectroscopie cellulaire diélectrique pour confirmer nos résultats et développer un test clinique performant. Le système CellKey™ a été conçu pour l'étude des récepteurs couplés aux protéines G. Il a été montré que son utilisation pourrait s'élargir aux récepteurs tyrosine kinases et aux récepteurs nucléaires (Verdonk & coll. 2006; Peters & coll. 2007). Ce système présente plusieurs avantages. D'un côté, les analyses effectuées ne nécessitent ni manipulation ni traitement préalable donnant ainsi une idée plus réelle sur les changements survenus dans ces cellules. D'un autre côté, il est possible d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps et en utilisant peu de cellules. Le fait que ce système soit automatisé nous assure d'avoir des résultats plus précis et reproductibles.

En utilisant cette technique, nous avons analysé différents types cellulaires (lymphocytes, myoblastes et ostéoblastes) provenant de patients SIA et de sujets sains. Nos résultats confirment que tous les patients SIA testés présentent un défaut de signalisation de la mélatonine. Ces analyses ont montré la même classification, en trois groupes fonctionnels, que celle publiée précédemment (Azeddine & coll. 2007). Ces résultats sont très intéressants au niveau clinique vu qu'ils ont montré la faisabilité du test sur des lymphocytes isolés à partir d'une simple prise de sang.

Les mécanismes moléculaires régissant les trois groupes diffèrent d'un groupe à l'autre. Par exemple, le traitement des cellules du groupe 1 avec l'œstradiol induit une correction partielle de la signalisation de la mélatonine. Par contre chez les cellules de patients appartenant aux groupes 2 et 3, l'œstradiol aggrave la signalisation de la mélatonine (Letellier & coll. 2008). Dans cette étude, il a été prouvé que chez les cellules de patients du groupe 1, l'augmentation des taux d'AMPc suite au traitement à la mélatonine est due à un couplage préférentiel des sous unités *G α s* (stimulatrice de l'activité des adénylates cyclases) aux récepteurs de la mélatonine qui sont normalement couplés aux sous-unités *G α i* (inhibitrices de l'activité des adénylates cyclases) (Letellier & coll. 2008).

Classification moléculaire des patients SIA

Afin de vérifier si les différences entre les différents groupes de patients SIA ne seraient pas dues à des changements au niveau moléculaire, nous avons investigué l'interaction du récepteur de la mélatonine MT2 avec des molécules impliquées dans la régulation de la voie de signalisation de la mélatonine. Notre intérêt envers le récepteur MT2 découle du fait qu'il est le plus abondant des deux récepteurs membranaires de la mélatonine dans les ostéoblastes. Une autre évidence découle des travaux de Roth & coll. qui ont montré que l'effet de la mélatonine sur les ostéoblastes est inhibé par le luzindole, un antagoniste présentant une affinité plus grande pour le récepteur MT2 (Roth & coll. 1999). Ce récepteur forme un gros complexe protéique de 525 kDa (Barrett & coll. 1994) dont on connaît très peu les différents partenaires d'interaction. L'un des partenaires connu

est le récepteur MT1 car il a été montré que les deux récepteurs sont présents dans les cellules principalement sous forme d'hétérodimères (Ayoub & coll. 2004). Le constat de la dimérisation des GPCR a bouleversé notre compréhension des mécanismes d'action de ces récepteurs. Dans le cadre de cette thèse le statut de dimérisation des récepteurs MT1 et MT2 n'a pas été pris en considération lors de l'analyse de la signalisation de la mélatonine. Néanmoins, il serait intéressant de prendre en considération ce nouveau paramètre dans de prochaines études.

Nous avons démontré précédemment que le défaut de la voie de signalisation de la mélatonine est causé par une phosphorylation accrue des protéines G_i au niveau des résidus sérine (Moreau & coll. 2004). La phosphorylation de la sous unité $G\alpha$ des protéines G à leur extrémité N-terminale est bien connue pour induire l'inactivation de ces protéines en empêchant la formation d'hétérotrimères fonctionnels avec les sous unités $G\beta$ et $G\gamma$ (Strassheim & Malbon 1994). Vu que les protéines G_i sont couplées à une multitude de récepteurs, nous nous sommes demandé si la signalisation à travers ces récepteurs serait aussi affectée. Nous avons donc utilisé la technique de la SCD pour analyser ces voies de signalisation et nous avons démontré que le défaut de signalisation est généralisé à tous les récepteurs couplés aux protéines G_i (Akoumé, Azeddine & coll. en préparation).

Parmi les kinases pouvant phosphoryler les protéines G_i , on retrouve PKC δ (Murthy & coll. 2000). Notre intérêt envers PKC δ découle du fait qu'en plus d'être une sérine/thréonine kinase pouvant phosphoryler les protéines G_i (du moins *in vitro*) (Murthy

& coll. 2000), elle peut être localisée à la membrane via la protéine d'échafaudage Rack1. De plus, l'activité de PKC δ est amplifiée par la phosphorylation de résidus tyrosine notamment par la tyrosine kinase Src (Shanmugam & coll. 1998). Ceci est d'autant plus intéressant puisque Barrett & coll. ont démontré que la voie de signalisation de la mélatonine est modulée par une tyrosine kinase dont la nature demeure encore indéterminée (Barrett & coll. 2000). Par contre, elle peut être inhibée par l'action d'une tyrosine phosphatase. Ceci est intéressant vu que plusieurs récepteurs tyrosine phosphatase (PTPR) se trouvent dans des loci de susceptibilité à la SIA (PTPRM, PTPRC, PTPRJ, PTPRB, PTPRS et PTPRR). À l'exception de PTPRM, les rôles de ces PTPR ne sont pas encore bien définis.

Peu de choses sont connues sur le rôle de PKC δ dans la signalisation de la mélatonine bien que plusieurs études aient été effectuées dans le but de déterminer l'interaction de PKC avec la signalisation de la mélatonine (Bellon & coll. 2007; Martin & coll. 2007; Martin & coll. 2009). Toutefois, la plupart n'ont pas étudié une isoforme spécifique de PKC. Les rôles de PKC dans la signalisation de la mélatonine diffèrent d'une cellule à l'autre. D'une part, la mélatonine stimule l'activité de PKC par l'induction d'un changement conformationnel de PKC suite à sa liaison directe sur l'enzyme dans les cellules de foie MDCK (Ramirez-Rodriguez & coll. 2007) ainsi que chez les cellules de neuroblastome de souris N1E-115 (Benitez-King 2000; Bellon & coll. 2007). D'autre part, la mélatonine inhibe la signalisation en aval de PKC notamment l'inhibition de c-fos qui est stimulé par PKC dans les fibroblastes (L-cells) (Ross & coll. 1998), ainsi que l'inhibition

de la voie PKC/Akt/NF- κ B dans les cellules cancéreuses C6 (Martin & coll. 2007). Chez les ostéoblastes l'effet de la mélatonine sur la signalisation de PKC δ n'est pas documenté. Toutefois la mélatonine et le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, un activateur de PKC) stimulent la prolifération des ostéoblastes (Nakade & coll. 1999; Lampasso & coll. 2002), d'où la possibilité que l'effet de la mélatonine sur les ostéoblastes soit médiée par une activation de PKC δ .

Afin d'étudier l'interaction entre PKC δ et le récepteur MT2, nous avons utilisé des extraits membranaires d'ostéoblastes dérivés de quelques patients SIA appartenant aux trois groupes fonctionnels et quelques sujets témoins issus de cultures primaires d'ostéoblastes ainsi que la lignée cellulaire ostéoblastique MG63 qui est utilisée dans la plupart des études comme ostéoblastes normaux puisque cette lignée cellulaire partage plusieurs caractéristiques avec les ostéoblastes normaux (Pautke & coll. 2004). Nos résultats de co-immunoprécipitation (Co-IP) montrent que PKC δ n'interagit pas avec MT2 dans les cellules MG63 et les ostéoblastes des sujets contrôles (#2700, 2750, 2775 et 2791), par contre cette interaction existe chez plusieurs patients SIA (Azeddine & coll. 2007). Notamment les patients du groupe 3 (#1084, 1261, 1266 et 1377) chez lesquels l'interaction de PKC δ avec MT2 n'est pas dépendante de la mélatonine.

Ces observations ne nous permettent pas de conclure si l'interaction du récepteur MT2 avec PKC δ est directe ou bien si elle est médiée par une autre protéine. Cependant la présence de PKC δ dans ce complexe peut, via différents mécanismes, amener à la

désensibilisation de la signalisation de la mélatonine et ainsi expliquer, en partie, le défaut observé chez certains patients SIA. Premièrement tel que cité plus haut, PKC δ pourrait induire la diminution ou l'arrêt du signal transduit par la mélatonine en inhibant les protéines Gi suite à leur phosphorylation (Murthy & coll. 2000). Deuxièmement, il a été montré que les PKCs jouent un rôle important au niveau de la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs à mélatonine (Gilad & coll. 1997) bien que les sites de phosphorylation des récepteurs de la mélatonine par les PKCs ne soient pas encore identifiés. Un troisième mécanisme pourrait être la désensibilisation des adénylates cyclases via leur phosphorylation. En effet, il a été montré que la phosphorylation de certaines isoformes d'adénylates cyclases induit l'augmentation de leur activité ce qui pourrait expliquer l'augmentation des taux d'AMPc chez certains patients SIA (Tabakoff & coll. 2001; Beazely & Watts 2006; Schallmach & coll. 2006). D'un autre côté, l'analyse des interactions entre PKC δ et Rack1 par Co-IP chez les patients SIA et les cellules MG63 montre des patrons d'interaction différents de ceux obtenus pour l'interaction entre MT2 et PKC δ , ce qui pourrait suggérer que 1) l'interaction de PKC δ avec le récepteur MT2 n'est pas toujours dépendante de sa liaison avec Rack1, 2) il est possible que PKC δ soit peu ou pas actif ce qui expliquerait l'absence d'interaction avec Rack1 qui ne reconnaît en principe que la forme active et expliquerait aussi la détection d'une interaction avec MT2.

En conclusion, nos résultats montrent une nouvelle interaction entre PKC δ et le récepteur MT2, cependant il faudrait augmenter le nombre de patients et de sujets témoins

analysés afin de pouvoir tirer des conclusions sur la signification biologique de cette interaction. Il faudrait aussi étudier plus en détail le statut de phosphorylation des molécules impliquées dans la voie de signalisation de la mélatonine, étudier l'effet d'inhibiteurs spécifiques des PKCs sur cette signalisation, plus spécifiquement sur la phosphorylation des protéines Gi et sur l'interaction de PKC δ avec le récepteur MT2. D'un autre côté, il est nécessaire de déterminer plus précisément les résidus phosphosérine des protéines Gi chez les patients SIA par la technique de spectrométrie de masse ce qui pourrait faciliter l'identification de la kinase responsable de cette phosphorylation. Une stratégie alternative serait d'étudier le profil d'activité des kinases chez les patients SIA et le comparer aux sujets normaux. Actuellement, plusieurs compagnies offrent ce genre de service tel que le SelectScreen® Kinase Profiling d'Invitrogen.

Mise en évidence du rôle de l'OPN dans le développement de la SIA

Nous avons démontré que chez l'humain la SIA serait due à un défaut de signalisation de la mélatonine, alors que chez les modèles animaux de scoliose tels que les poulets et les rats pinéaléctomisés, c'est plutôt une carence en mélatonine qui en est la cause. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle la carence en mélatonine ou bien le défaut de sa signalisation induisent le développement de la maladie via un effecteur commun. Cet effecteur devrait agir comme mécanorécepteur vu l'importance des contraintes biomécaniques dans l'étiologie de la maladie. Ceci a été démontré par le fait que les souris et les rats pinéaléctomisés doivent être bipèdes pour qu'ils développent la

scoliose. De plus, ce facteur devrait être circulant vu la grande majorité des tissus affectés chez les patients SIA. Finalement, ce facteur doit jouer un rôle important au niveau du maintien de l'équilibre et de la proprioception. Parmi plusieurs candidats potentiels nous avons identifié l'ostéopontine. Nous allons discuter des évidences qui prouvent que cette protéine joue un rôle important dans l'étiopathogenèse de la scoliose chez les modèles animaux ainsi que chez les patients scoliotiques.

La première évidence de l'implication de l'OPN dans le développement de la scoliose vient des expériences menées chez le poulet pinéalectomisé. Ce modèle animal a été largement utilisé pour étudier le développement de la scoliose et son lien avec la mélatonine. Le poulet présente plusieurs avantages. En plus d'être naturellement bipède, il a une croissance rapide permettant l'étude du développement de la scoliose en peu de temps (environ 30 jours). L'analyse anatomique des poulets pinéaléctomisés montre que la scoliose chez le poulet partage plusieurs caractéristiques avec la scoliose chez l'homme (Machida & coll. 2001). D'un autre côté l'ablation de la glande pinéale est facilitée par sa localisation au niveau de la partie superficielle du cerveau, donc facilement accessible. L'utilisation de poulet contrôle ayant subi la même chirurgie a montré que la chirurgie en elle-même n'induit pas de développement de scoliose. L'effet protecteur des traitements quotidien avec la mélatonine contre le développement de scoliose montre que c'est l'absence de mélatonine qui cause la scoliose chez les poulet pinéaléctomisés (Beuerlein & coll. 2001).

Nos études chez le poulet pinéaléctomisé ont effectivement montré une augmentation marquée de l'OPN au niveau protéique et de l'ARNm dans la musculature paraspinale uniquement chez les poulets scoliotiques. Toutefois, afin de vérifier si cette augmentation ne serait qu'une conséquence de la maladie, nous avons traité les poulets dès le premier jour après leur éclosion (la pinéaléctomie étant effectuée au troisième jour) avec des doses quotidiennes d'un inhibiteur transcriptionnel de l'OPN (THX99). Nous avons constaté une baisse de 50% du nombre de poulets scoliotiques chez les poulets traités (Fig. 6).

Afin d'avoir une preuve génétique de l'implication de l'OPN dans l'étiopathogenèse de la scoliose, nous avons utilisé un autre modèle animal, soit la souris C57Bl/6 naturellement déficiente en mélatonine. Les avantages de ce modèle animal résident dans le fait qu'ils soient des mammifères donc génétiquement plus proche de l'Homme, de la possibilité de les manipuler génétiquement (knock-out) et de leur petite taille, d'où la facilité d'étudier un grand nombre d'individus.

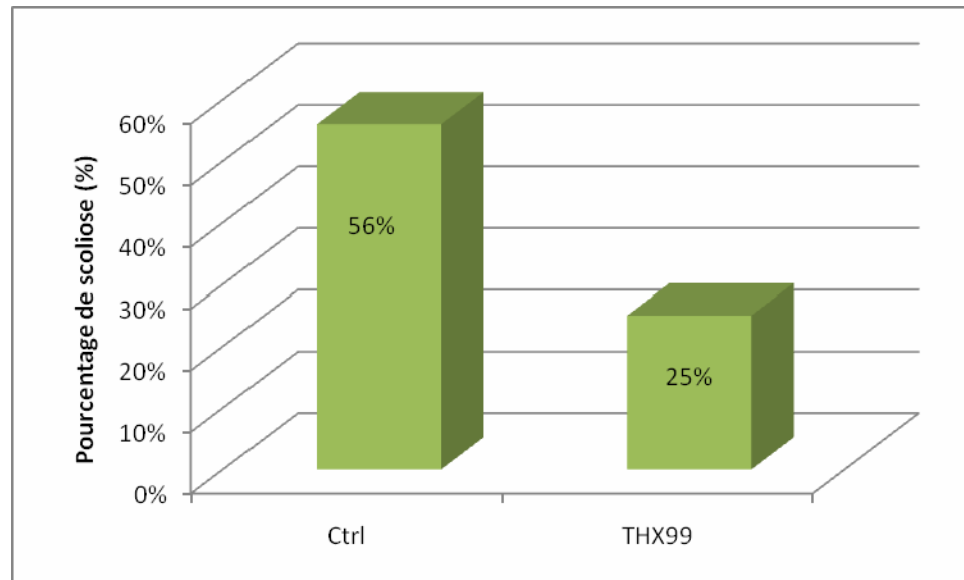


Figure 8. Effet du traitement des poulets avec un inhibiteur transcriptionnel de l'OPN sur le taux d'induction de scoliose. Les poulets pinéaléctomisés développent la scoliose à un taux de 56% (n=18). Le traitement au THX99 induit une diminution de presque 50% sur le pourcentage de développement de la maladie, puisque seulement 25% des poulets traités développent la maladie (n=25).

Nous nous sommes également inspirés des travaux du Dr Machida qui a démontré que 64% des souris C57Bl/6 développent une scoliose lorsque maintenues en mode bipède (Oyama & coll. 2006). Nous avons montré que 37% (18/49) des souris bipèdes générées dans notre laboratoire développent la maladie. Ce pourcentage est nettement moins élevé que ce que Oyama & coll. ont obtenu, probablement à cause du faible nombre (14) de souris utilisées dans leurs expériences (Oyama & coll. 2006). Les souris C57Bl/6 femelles sont plus susceptibles de devenir scoliotiques puisque nos travaux ont montré que 46% de ces souris développent une scoliose. De plus, ces souris sont plus sévèrement atteintes comparativement aux souris mâles dont seulement 24% développent la maladie (tableau 3 page 162). Ce dernier modèle animal présente donc de grandes similitudes avec la maladie chez l'humain.

Nous avons utilisé la même approche expérimentale pour générer des souris OPN KO bipèdes. Nos résultats ont montré qu'aucune de ces souris OPN KO ne développe la maladie contrairement aux souris C57Bl/6 bipèdes, ce qui montre, sans aucun doute, que l'OPN joue un rôle primordial comme facteur initiateur de la scoliose. Les travaux de Machida & coll. ont montré que même les souris C3H/HeJ bipèdes qui ne présentent pas de carence en mélatonine développent la maladie à un pourcentage inférieur (25%) à celui observé chez les souris C57Bl/6. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la chirurgie effectuée pour générer des souris bipèdes induirait une augmentation des niveaux circulants d'OPN vu que c'est une cytokine essentielle pour la guérison des plaies (Liaw & coll. 1998;

Pedraza & coll. 2008). La nécessité de recourir à la chirurgie pour induire la scoliose chez les souris présente le principal inconvénient de l'utilisation de ce modèle animal car la chirurgie cause un stress majeur pour l'animal.

Rôles de l'OPN dans la SIA chez l'humain

Chez les patients scoliotiques, nos résultats ont montré une augmentation significative des taux circulants d'OPN comparativement aux sujets témoins. Cette augmentation est plus prononcée chez les patients sévèrement atteints, puisque nos tests statistiques montrent une corrélation positive entre les niveaux plasmatiques en OPN et la sévérité de la maladie. En effet, le dosage de l'OPN peut servir comme biomarqueur pour discriminer les patients ayant un angle de Cobb de moins de 45° de ceux sévèrement atteints (angle de Cob $\geq 45^\circ$). En effet, chaque augmentation des niveaux d'OPN de 100 ng/ml est associée à une augmentation d'environ deux fois le risque de développer une scoliose sévère.

Plusieurs études ont montré que 20 à 40% des enfants nés de parents scoliotiques développent une scoliose comparativement à 4% dans la population générale (De George & Fisher 1967; Wynne-Davies 1968). Afin de vérifier si l'OPN joue un rôle important dans l'initiation des déformations rachidiennes et ainsi prédire le début imminent de la maladie, nous avons entrepris une étude longitudinale dans laquelle une cohorte constituée d'enfants à risque (nés d'au moins un parent scoliotique) a été comparée à une cohorte constituée d'enfants normaux sans antécédents familiaux de scoliose qui ont été recrutés dans les

écoles de Montréal et la clinique de pédiatrie de Laval. Nos résultats ont montré une augmentation significative des niveaux plasmatiques d'OPN chez le groupe à risque comparativement au groupe contrôle. De plus, le suivi des patients sur une période d'au moins 24 mois a permis de montrer que les enfants à risque présentant des concentrations plasmatiques élevées en OPN pendant une longue période développent la maladie. De plus, l'analyse de ces données a montré que les garçons présentent des niveaux plus élevés en OPN comparativement aux filles bien que les filles soient plus à risque de développer la maladie. Cette observation suggère l'implication des hormones sexuelles dans la régulation des niveaux circulants en OPN à la puberté.

En conclusion, ces résultats confirment que l'OPN joue un rôle dans l'initiation de la maladie et qu'il est possible de l'utiliser comme biomarqueur pour dépister les enfants à risque de développer la maladie et ceux dont la déformation rachidienne va progresser. Ceci est d'autant plus important qu'il n'existe à ce jour aucune méthode qui permet de prédire la progression de la maladie.

Par ailleurs, il existe une corrélation entre certains symptômes associés à la scoliose et la surexpression de l'OPN. Par exemple, il est connu que les patients scoliotiques souffrent de problèmes de proprioception (Missaoui & coll. 2008) qui sont contrôlés par des centres où l'OPN joue un rôle important. En effet, Lee & coll. ont montré que l'OPN est exprimée dans le cervelet et dans certaines régions du cerveau telle la région stimulée par les mouvements. Ils ont aussi montré que l'OPN contribue au processus de

développement et de maturation des neurones (Lee & coll. 2001). D'un autre côté, Ichikawa & coll. ont montré que l'OPN est exprimée dans les fuseaux neuromusculaires (Ichikawa & coll. 2000) qui sont situés dans les muscles squelettiques et sont responsables de relayer les informations proprioceptives au système nerveux central. Cette étude présente l'OPN comme un mécanorécepteur, rôle qui est supporté par l'observation que les souris déficientes en OPN ne répondent plus aux stimuli mécaniques (Morinobu & coll. 2003). Par contre l'effet d'une augmentation des niveaux d'OPN sur la sensation des stimuli mécaniques est inconnu.

Les patients scoliotiques présentent aussi des problèmes d'équilibre (Missaoui & coll. 2008) impliquant le système vestibulaire par le biais du contrôle de la tonicité des muscles reliés au maintien postural. Les récepteurs sensoriels du système vestibulaire sont situés dans l'oreille interne dans laquelle une expression de l'OPN a été détectée (Sakagami 2000). Le rôle exact de l'OPN dans ces structures n'est pas encore connu, par contre les auteurs de cette étude suggèrent que l'OPN pourrait être impliquée dans la régulation du flux des ions dans le liquide de l'oreille interne. Plus récemment, Zhao & coll. ont analysé les fonctions de l'oreille interne chez les souris OPN^{-/-} et ont montré que l'absence de l'OPN n'affecte pas les fonctions de l'oreille interne et du maintien de l'équilibre (Zhao & coll. 2008). Cependant il est possible qu'une augmentation de l'OPN affecte ces fonctions.

Finalement, il a été montré que les patients scoliotiques sont ostéopéniques (Cheng & coll. 2006), par contre il n'a pas été reporté si cette ostéopénie résulte d'une diminution

de la formation de l'os par les ostéoblastes ou bien d'une activité augmentée de résorption osseuse par les ostéoclastes. Il est bien connu que l'OPN joue un rôle important dans l'os, tant pour l'adhésion et la différenciation des ostéoblastes que pour la migration et la résorption osseuse par les ostéoclastes. Puisque les souris OPN^{-/-} possèdent des os plus résistants et plus minéralisés que les souris sauvages (Boskey & coll. 2002), il est donc possible d'envisager qu'une augmentation des niveaux d'OPN induirait l'effet contraire soit une ostéopénie.

Par quel mécanisme l'OPN induit elle la déformation rachidienne?

Afin de définir le mécanisme par lequel l'OPN induit la déformation rachidienne, nous avons décidé de refaire les mêmes expériences avec des souris déficientes en récepteurs d'OPN, notamment les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et le CD44. Malheureusement, le knock-out de la sous-unité α_v des intégrines est létal (Bader & coll. 1998), et les souris déficientes en sous-unité β_3 sont hémorragiques vu son importance dans la physiologie des plaquettes (Maxwell & coll. 2004), d'où la difficulté de les opérer pour générer des souris bipèdes. Nous avons généré des souris déficientes en CD44 bipèdes et avons montré qu'aucune de ces souris ne développe la scoliose. Toutefois ceci ne démontre pas hors de tout doute que la signalisation de l'OPN via le récepteur CD44 est essentielle pour le développement de la scoliose puisque l'absence de CD44 entraîne une baisse importante de la synthèse d'OPN. La co-régulation de l'OPN avec le récepteur CD44 est un phénomène bien connu mais le mécanisme sous-jacent demeure encore obscure (Denhardt & coll. 2001).

Plusieurs études ont montré l'implication du CD44 dans une multitude de pathologies, et plus particulièrement le CD44 soluble (sCD44) (Franzmann & coll. 2007; Hasegawa & coll. 2008). Le sCD44 peut agir comme un récepteur leurre (decoy receptor) pouvant compétitionner avec le récepteur CD44 de surface. Cette caractéristique nous a poussés à analyser les niveaux circulants du sCD44 chez les patients scoliotiques et les sujets normaux. Nous avons démontré que les taux du sCD44 circulants sont plus élevés chez les sujets témoins comparativement aux patients sévèrement atteints. Les tests statistiques ont montré qu'une augmentation de 100 ng/ml a un effet protecteur réduisant de 1,4 fois le risque de développement d'une scoliose sévère. Cependant le mécanisme par lequel la signalisation OPN-CD44 induit les déformations rachidiennes reste à déterminer. Une meilleure compréhension des mécanismes expliquant la relation entre les niveaux d'OPN et les niveaux de CD44 ainsi que l'étude des fonctions biologiques de ces deux protéines dans les tissus atteints chez les patients scoliotiques apportera plus d'éclaircissements sur les cibles en aval de cette signalisation et le ou les mécanismes causant les déformations rachidiennes.

Causes possibles de l'augmentation des niveaux de l'OPN

Tel que discuté précédemment, l'OPN est exprimée dans une grande variété de cellules et de tissus. Elle est impliquée dans une multitude de processus biologiques. S'ajoute à cette complexité le fait que l'OPN est une protéine sécrétée et transportée partout dans le corps. D'où la difficulté de déterminer la source de l'augmentation des niveaux de

l'OPN dans le sang. Plusieurs études ont reporté des niveaux circulants élevés d'OPN dans différentes pathologies, telle que le cancer et dont la cause diffère d'une condition pathologique à une autre. Dans cette section, nous allons discuter principalement des facteurs qui sont à la fois connus pour induire une augmentation de l'expression de l'OPN et qui peuvent être impliqués dans l'étiologie de la SIA.

1- Les hormones sexuelles : Au Québec et ailleurs dans le monde la scoliose affecte quatre fois plus de filles que de garçons (Shohat & coll. 1988). Dans la majorité des cas les jeunes filles sont affectés à l'âge de la puberté où la production des estrogènes commence à devenir plus importante. Les filles scoliotiques présentent aussi des hauts niveaux de testostérone comparativement aux sujets normaux (Skogland & Miller 1980; Raczkowski 2007). Parallèlement, il a été démontré que ces deux hormones peuvent induire la surexpression de l'OPN. En effet, Craig & coll. ont montré la présence d'éléments de réponse aux estrogènes sur le promoteur de l'OPN murine (Craig & Denhardt 1991). Plus récemment Zingibl & coll. ont montré que l'expression de l'OPN pourrait être activée par le récepteur ERR alpha (Zirngibl & coll. 2008). D'un autre côté, Chang & coll. ont montré que la testostérone est capable de stimuler l'expression de l'OPN (Chang & coll. 2001). Il semblerait que l'effet de la testostérone soit plus prononcé que celui des estrogènes vu que les garçons ont des niveaux circulants d'OPN plus élevés que les filles. Une analyse plus poussée des niveaux d'estrogènes et de testostérone dans nos cohortes est nécessaire afin de clarifier la corrélation entre ces deux hormones et l'OPN.

2- L'hypoxie : Rivard & coll. ont montré que l'exposition de souris gestantes à des conditions hypoxiques induit le développement de déformation rachidiennes dans les rejets de ces souris (Rivard & coll. 1982). L'hypoxie est connue pour son effet activateur de l'expression de l'OPN (Sodhi & coll. 2001). Il a été montré que cet effet est médié par l'élément de réponse à l'oncogène Ras présent sur le promoteur de l'OPN (Zhu & coll. 2005).

3- Prédiposition génétique : plusieurs études ont clairement mis en évidence que la SIA survient avec une fréquence plus élevée dans certaines familles indiquant que la SIA pourrait être causée par une prédisposition génétique héréditaire. Depuis la fin du séquençage du génome humain, plusieurs polymorphismes ont été identifiés ouvrant la voie à la multiplication d'études d'association entre des polymorphismes et certaines pathologies. Giacomelli & coll. ont montré la présence de certains polymorphismes dans le promoteur de l'OPN induisant l'augmentation de son expression (Giacomelli & coll. 2004). Les résultats préliminaires de notre laboratoire indiquent la présence d'une association entre certains polymorphismes du promoteur de l'OPN et la SIA. L'étude d'une plus grande cohorte de patients scoliotiques et de sujets témoins est en cours afin de valider cette association.

4- le sélénium : Il a été démontré que les concentrations de sélénium dans le plasma des patients atteints de SIA étaient considérablement diminuées (Dastych & Cienciala 2002). Ceci a attiré notre attention puisque le sélénium, et plus spécifiquement le Se-

méthylselenocystéine, un organosélénium naturel sont utilisés pour prévenir des métastases dans le cancer du sein comme agent thérapeutique chimopréventif, en ciblant la transcription de l'OPN (El-Bayoumy & Sinha 2005).

5- Exposition aux mycobactéries : la scoliose est plus communément retrouvée parmi les patients infectés par *Mycobacterium avium* (52%) comparé aux patients tuberculeux infectés par *M. tuberculosis* (13%) et la population générale (Iseman & coll. 1991). De plus, des mycobactérioses zoonotiques chez les poissons zèbres de laboratoire causées par *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium chelonae* mènent aussi à la formation de scoliose (Seok & coll. 2006). L'exposition environnementale aux mycobactéries semble plus commune et fréquente qu'attendue. Une revue de la littérature démontre que l'environnement des piscines intérieures fournit un habitat convenable pour la survie et la reproduction des mycobactéries (Leoni & coll. 1999). De plus, il a été montré que les enfants qui nageaient dans une piscine intérieure dans leur première année de vie présentent un plus grand risque d'être atteints de SIA (McMaster & coll. 2006). Une association entre l'exposition aux mycobactéries et l'OPN existe puisque des niveaux plasmatiques d'OPN élevés ont été retrouvés chez les patients atteints d'infections mycobactériennes (Koguchi & coll. 2003).

Développement d'un test diagnostique pour la SIA

Les cliniciens qui prennent en charge les patients atteints de scoliose sont confrontés à deux problèmes, la difficulté d'un diagnostic précoce et l'absence de techniques pouvant

prévoir la progression des déformations rachidiennes d'où la problématique du choix d'un traitement adéquat. Le diagnostic d'une scoliose n'est effectué que lorsque la déviation de la colonne commence à être apparente. Donc la mise au point d'un test diagnostique risque fort bien de transformer la façon dont les patients scoliotiques sont pris en charge et induira des changements majeurs dans le choix des traitements prescrits. Le test est relativement simple et consiste en une simple analyse de la fonctionnalité de la voie de signalisation de la mélatonine effectuée sur les PBMCs isolés à partir d'une simple prise de sang chez les patients à tester. Nos résultats ont montré la faisabilité de tester la voie de signalisation de la mélatonine sur des PBMCs en utilisant la technique de spectroscopie cellulaire diélectrique. La fiabilité et la précision de cette technique nous permettra de conclure avec plus de certitude si un patient présente ou pas un défaut dans la signalisation de la mélatonine.

Perspectives

Le travail effectué dans le cadre de cette thèse a permis une grande avancée dans la compréhension des mécanismes induisant la SIA bien que le chemin soit encore long pour déterminer l'ensemble des gènes et facteurs contribuant à la SIA. Nous avons démontré un défaut de signalisation de la voie de signalisation des récepteurs couplées aux protéines Gi causé par une phosphorylation anormale de ces protéines au niveau des résidus sérine. La continuité logique de ce travail serait d'identifier les résidus phosphorylés par des techniques de spectrométrie de masse, ce qui permettra de déterminer la ou les kinases responsables de cette modification. D'un autre côté, il faudrait continuer à caractériser les différences moléculaires entre les trois groupes fonctionnels afin de pouvoir expliquer ces différences mais aussi de développer des outils pharmacologiques capables de restaurer la signalisation à travers les récepteurs couplés aux protéines Gi.

Nos études ont permis aussi de déterminer le rôle important de l'OPN comme facteur initiateur de la SIA. La suite logique de ce travail serait de déterminer dans un premier temps les mécanismes induisant l'augmentation des niveaux circulants de l'OPN. Pour ce faire, une étude du promoteur de l'OPN est déjà en cours dans notre laboratoire. En effet, le séquençage du promoteur de l'OPN chez une dizaine de patients scoliotiques et de sujets témoins a permis de montrer l'existence de polymorphismes qui seraient associés à la maladie. L'étude d'un plus grand nombre de patients scoliotiques et de sujets témoins est en cours afin de pouvoir déterminer si ces différences sont statistiquement

significatives. En parallèle, l'effet de plusieurs facteurs environnementaux tels que l'exposition aux mycobactéries ou la diète sur l'expression de l'OPN devra être étudié. Dans un deuxième temps, il faudrait se concentrer sur l'étude des modifications posttraductionnelles que subit l'OPN circulante en utilisant des techniques de spectrométrie de masse, Puisque l'OPN peut avoir des fonctions biologiques distinctes selon les MPTs qu'elle subit (Christensen & coll. 2007).

Conclusion

Les travaux rapportés dans cette thèse ont permis de valider nos hypothèses et d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés via la réalisation de quatre articles scientifiques. Nous avons confirmé le défaut de signalisation de la mélatonine et autres récepteurs couplés aux protéines Gi en utilisant une nouvelle technique qui permettra l'accélération de la mise en place et de la validation clinique du test diagnostique pour la SIA. Ce dernier constitue un accomplissement majeur qui devrait avoir un impact sur la façon avec laquelle les patients scoliotiques sont pris en charge. Nous avons aussi ouvert la voie pour la découverte des kinases ou des phosphatases responsables de la phosphorylation anormale des protéines Gi permettant la découverte éventuelle des gènes qui causent la maladie. Finalement, l'identification de l'OPN comme facteur initiateur de la SIA représente une découverte qui devra conduire au développement de nouvelles thérapies permettant d'arrêter la progression des déformations rachidiennes et de les traiter dans le futur grâce à des approches pharmacologiques.

Bibliographie

- Aherrahrou, Z., S. B. Axtner, P. M. Kaczmarek, A. Jurat, S. Korff, L. C. Doebling, D. Weichenhan, H. A. Katus and B. T. Ivandic (2004). "A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice." Am J Pathol **164**(4): 1379-87.
- Alam, T. N., M. J. O'Hare, I. Laczko, A. Freeman, F. Al-Beidh, J. R. Masters and D. L. Hudson (2004). "Differential expression of CD44 during human prostate epithelial cell differentiation." J Histochem Cytochem **52**(8): 1083-90.
- Andersson, G., B. Ek-Rylander, K. Hollberg, J. Ljusberg-Sjolander, P. Lang, M. Norgard, Y. Wang and S. J. Zhang (2003). "TRACP as an osteopontin phosphatase." J Bone Miner Res **18**(10): 1912-5.
- Ashkar, S., G. F. Weber, V. Panoutsakopoulou, M. E. Sanchirico, M. Jansson, S. Zawaideh, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, M. J. Glimcher and H. Cantor (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." Science **287**(5454): 860-4.
- Ayoub, M. A., A. Levoye, P. Delagrangue and R. Jockers (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Mol Pharmacol **66**(2): 312-21.
- Azeddine, B., K. Letellier, S. Wang da, F. Moldovan and A. Moreau (2007). "Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis." Clin Orthop Relat Res **462**: 45-52.

- Bader, B. L., H. Rayburn, D. Crowley and R. O. Hynes (1998). "Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all α_v integrins." Cell **95**(4): 507-19.
- Barrett, P., W. S. Choi, M. Morris and P. Morgan (2000). "A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin." FASEB J **14**(11): 1619-28.
- Barrett, P., A. MacLean and P. J. Morgan (1994). "Evidence for multiple forms of melatonin receptor-G-protein complexes by solubilization and gel electrophoresis." J Neuroendocrinol **6**(5): 509-15.
- Bartolazzi, A., D. Jackson, K. Bennett, A. Aruffo, R. Dickinson, J. Shields, N. Whittle and I. Stamenkovic (1995). "Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants." J Cell Sci **108 (Pt 4)**: 1723-33.
- Bartolazzi, A., A. Nocks, A. Aruffo, F. Spring and I. Stamenkovic (1996). "Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan." J Cell Biol **132**(6): 1199-208.
- Beazely, M. A. and V. J. Watts (2006). "Regulatory properties of adenylate cyclases type 5 and 6: A progress report." Eur J Pharmacol **535**(1-3): 1-12.
- Bellon, A., L. Ortiz-Lopez, G. Ramirez-Rodriguez, F. Anton-Tay and G. Benitez-King (2007). "Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase." J Pineal Res **42**(3): 214-21.

- Beninati, S., D. R. Senger, E. Cordella-Miele, A. B. Mukherjee, I. Chackalaparampil, V. Shanmugam, K. Singh and B. B. Mukherjee (1994). "Osteopontin: its transglutaminase-catalyzed posttranslational modifications and cross-linking to fibronectin." J Biochem **115**(4): 675-82.
- Benitez-King, G. (2000). "PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells." J Pineal Res **29**(1): 8-14.
- Bennett, J. S., C. Chan, G. Vilaire, S. A. Mousa and W. F. DeGrado (1997). "Agonist-activated α v β 3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin." J Biol Chem **272**(13): 8137-40.
- Beuerlein, M., X. Wang, M. Moreau, J. Raso, J. Mahood and K. Bagnall (2001). "Development of scoliosis following pinealectomy in young chickens is not the result of an artifact of the surgical procedure." Microsc Res Tech **53**(1): 81-6.
- Boskey, A. L., M. Maresca, W. Ullrich, S. B. Doty, W. T. Butler and C. W. Prince (1993). "Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel." Bone Miner **22**(2): 147-59.
- Boskey, A. L., L. Spevak, E. Paschalis, S. B. Doty and M. D. McKee (2002). "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone." Calcif Tissue Int **71**(2): 145-54.
- Brown, L. F., B. Berse, L. Van de Water, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Perruzzi, E. J. Manseau, H. F. Dvorak and D. R. Senger (1992). "Expression and distribution of

- osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces." Mol Biol Cell **3**(10): 1169-80.
- Bunemann, M. and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." J Physiol **517 (Pt 1)**: 5-23.
- Burger, E. H. and J. Klein-Nulen (1999). "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro." Adv Dent Res **13**: 93-8.
- Bushfield, M., G. J. Murphy, B. E. Lavan, P. J. Parker, V. J. Hruby, G. Milligan and M. D. Houslay (1990). "Hormonal regulation of Gi2 alpha-subunit phosphorylation in intact hepatocytes." Biochem J **268**(2): 449-57.
- Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." J Biol Chem **257**(13): 7847-51.
- Chabas, D., S. E. Baranzini, D. Mitchell, C. C. Bernard, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, R. A. Sobel, C. Lock, M. Karpuj, R. Pedotti, R. Heller, J. R. Oksenberg and L. Steinman (2001). "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease." Science **294**(5547): 1731-5.
- Chakraborty, G., S. Jain, T. V. Patil and G. C. Kundu (2008). "Down-Regulation of Osteopontin Attenuates Breast Tumor Progression in vivo." J Cell Mol Med.
- Chang, B. Y., K. B. Conroy, E. M. Machleder and C. A. Cartwright (1998). "RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins,

inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells." Mol Cell Biol **18**(6): 3245-56.

Chang, L., T. Feng, J. Li, C. Dou, J. Wei and Y. Guo (2001). "Regulation of osteopontin expression in a rat model of urolithiasis." Chin Med J (Engl) **114**(8): 829-32.

Chellaiah, M. A. and K. A. Hruska (2003). "The integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility." Calcif Tissue Int **72**(3): 197-205.

Chen, J. J., H. Jin, D. M. Ranly, J. Sodek and B. D. Boyan (1999). "Altered expression of bone sialoproteins in vitamin D-deficient rBSP2.7Luc transgenic mice." J Bone Miner Res **14**(2): 221-9.

Cheng, J. C., V. W. Hung, W. T. Lee, H. Y. Yeung, T. P. Lam, B. K. Ng, X. Guo and L. Qin (2006). "Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--longitudinal monitoring of bone mineral density until skeletal maturity." Stud Health Technol Inform **123**: 47-51.

Christensen, B., C. C. Kazanecki, T. E. Petersen, S. R. Rittling, D. T. Denhardt and E. S. Sorensen (2007). "Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties." J Biol Chem **282**(27): 19463-72.

Christensen, B., M. S. Nielsen, K. F. Haselmann, T. E. Petersen and E. S. Sorensen (2005). "Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in

- clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications." Biochem J **390**(Pt 1): 285-92.
- Chuang, T. T., L. Iacovelli, M. Sallese and A. De Blasi (1996). "G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications." Trends Pharmacol Sci **17**(11): 416-21.
- Ciambrone, G. J., V. F. Liu, D. C. Lin, R. P. McGuinness, G. K. Leung and S. Pitchford (2004). "Cellular dielectric spectroscopy: a powerful new approach to label-free cellular analysis." J Biomol Screen **9**(6): 467-80.
- Cichy, J., R. Bals, J. Potempa, A. Mani and E. Pure (2002). "Proteinase-mediated release of epithelial cell-associated CD44. Extracellular CD44 complexes with components of cellular matrices." J Biol Chem **277**(46): 44440-7.
- Cichy, J. and E. Pure (2003). "The liberation of CD44." J Cell Biol **161**(5): 839-43.
- Coghlan, V. M., B. A. Perrino, M. Howard, L. K. Langeberg, J. B. Hicks, W. M. Gallatin and J. D. Scott (1995). "Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein." Science **267**(5194): 108-11.
- Colombatti, A., E. N. Hughes, B. A. Taylor and J. T. August (1982). "Gene for a major cell surface glycoprotein of mouse macrophages and other phagocytic cells is on chromosome 2." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(6): 1926-9.
- Craig, A. M. and D. T. Denhardt (1991). "The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone." Gene **100**: 163-71.

- Craig, A. M., J. H. Smith and D. T. Denhardt (1989). "Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis." J Biol Chem **264**(16): 9682-9.
- Dalchau, R., J. Kirkley and J. W. Fabre (1980). "Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat." Eur J Immunol **10**(10): 745-9.
- Dastych, M. and J. Cienciala (2002). "Idiopathic scoliosis and concentrations of zinc, copper, and selenium in blood plasma." Biol Trace Elem Res **89**(2): 105-10.
- Davern, S. M., P. K. Lankford, L. J. Foote and S. J. Kennel (2002). "Monoclonal antibodies to CD44 epitopes on mouse endothelium." Hybrid Hybridomics **21**(5): 339-49.
- De George, F. V. and R. L. Fisher (1967). "Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects." J Med Genet **4**(4): 251-7.
- Denda, S., U. Muller, K. L. Crossin, H. P. Erickson and L. F. Reichardt (1998). "Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C." Biochemistry **37**(16): 5464-74.
- Denhardt, D. T. and X. Guo (1993). "Osteopontin: a protein with diverse functions." FASEB J **7**(15): 1475-82.
- Denhardt, D. T., D. Mistretta, A. F. Chambers, S. Krishna, J. F. Porter, S. Raghuram and S. R. Rittling (2003). "Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic

phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter."

Clin Exp Metastasis **20**(1): 77-84.

Denhardt, D. T. and M. Noda (1998). "Osteopontin expression and function: role in bone remodeling." J Cell Biochem Suppl **30-31**: 92-102.

Denhardt, D. T., M. Noda, A. W. O'Regan, D. Pavlin and J. S. Berman (2001).

"Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival." J Clin Invest **107**(9): 1055-61.

Dey, N. B., N. J. Boerth, J. E. Murphy-Ullrich, P. L. Chang, C. W. Prince and T. M.

Lincoln (1998). "Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells." Circ Res **82**(2): 139-46.

Disatnik, M. H., S. C. Boutet, C. H. Lee, D. Mochly-Rosen and T. A. Rando (2002).

"Sequential activation of individual PKC isozymes in integrin-mediated muscle cell spreading: a role for MARCKS in an integrin signaling pathway." J Cell Sci **115**(Pt 10): 2151-63.

Dufourny, L., A. Levasseur, M. Migaud, I. Callebaut, P. Pontarotti, B. Malpoux and P.

Monget (2008). "GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals." BMC Evol Biol **8**: 105.

Edwards, A. S. and J. D. Scott (2000). "A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and

beyond." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 217-21.

- Ehret, R., W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer and B. Wolf (1997). "Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures." Biosens Bioelectron **12**(1): 29-41.
- Ehret, R., W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde and B. Wolf (1998). "On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures." Med Biol Eng Comput **36**(3): 365-70.
- Ek-Rylander, B., T. Barkhem, J. Ljusberg, L. Ohman, K. K. Andersson and G. Andersson (1997). "Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase." Biochem J **321** (Pt 2): 305-11.
- Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard and G. Andersson (1994). "Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro." J Biol Chem **269**(21): 14853-6.
- El-Bayoumy, K. and R. Sinha (2005). "Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach." Mutat Res **591**(1-2): 224-36.
- El-Tanani, M., A. Platt-Higgins, P. S. Rudland and F. C. Campbell (2004). "Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription." J Biol Chem **279**(20): 20794-806.
- Elangbam, C. S., C. W. Qualls, Jr. and R. R. Dahlgren (1997). "Cell adhesion molecules--update." Vet Pathol **34**(1): 61-73.

- Feng, B., E. E. Rollo and D. T. Denhardt (1995). "Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme." Clin Exp Metastasis **13**(6): 453-62.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, B. Fohr, M. F. Young and N. S. Fedarko (2001). "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 460-5.
- Franzen, A. and D. Heinegard (1985). "Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix." Biochem J **232**(3): 715-24.
- Franzmann, E. J., E. P. Reategui, F. Pedroso, F. G. Pernas, B. M. Karakullukcu, K. L. Carraway, K. Hamilton, R. Singal and W. J. Goodwin (2007). "Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(7): 1348-55.
- Freedman, N. J. and R. J. Lefkowitz (1996). "Desensitization of G protein-coupled receptors." Recent Prog Horm Res **51**: 319-51; discussion 352-3.
- Furger, K. A., R. K. Menon, A. B. Tuck, V. H. Bramwell and A. F. Chambers (2001). "The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis." Curr Mol Med **1**(5): 621-32.
- Gheorghiu, E. (1996). "Characterizing cellular systems by means of dielectric spectroscopy." Bioelectromagnetics **17**(6): 475-82.

- Giachelli, C. M., D. Lombardi, R. J. Johnson, C. E. Murry and M. Almeida (1998). "Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo." Am J Pathol **152**(2): 353-8.
- Giacopelli, F., R. Marciano, A. Pistorio, P. Catarsi, S. Canini, G. Karsenty and R. Ravazzolo (2004). "Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity." Physiol Genomics **20**(1): 87-96.
- Gilad, E., H. Matzkin and N. Zisapel (1997). "Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells." Endocrinology **138**(10): 4255-61.
- Goldstein, L. A., D. F. Zhou, L. J. Picker, C. N. Minty, R. F. Bargatze, J. F. Ding and E. C. Butcher (1989). "A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins." Cell **56**(6): 1063-72.
- Gong, M., Z. Lu, G. Fang, J. Bi and X. Xue (2008). "A small interfering RNA targeting osteopontin as gastric cancer therapeutics." Cancer Lett.
- Goodfellow, P. N., G. Banting, M. V. Wiles, A. Tunnacliffe, M. Parkar, E. Solomon, R. Dalchau and J. W. Fabre (1982). "The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11." Eur J Immunol **12**(8): 659-63.
- Goto, M., I. Oshima, T. Tomita and S. Ebihara (1989). "Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains." J Pineal Res **7**(2): 195-204.

- Guo, W. and F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 816-26.
- Haegel-Kronenberger, H., H. de la Salle, A. Bohbot, J. Galon, E. Tartour, J. P. Cazenave and D. Hanau (1997). "Regulation of CD44 isoform expression and CD44-mediated signaling in human dendritic cells." Adv Exp Med Biol **417**: 83-90.
- Hasegawa, A., O. Yoshino, Y. Osuga, T. Hirata, T. Yano and Y. Taketani (2008). "High soluble CD44 concentration in peritoneal fluid in endometriosis." Fertil Steril **89**(5): 1267-8.
- He, B., M. Mirza and G. F. Weber (2006). "An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells." Oncogene **25**(15): 2192-202.
- Higashida, H., N. Hoshi, J. S. Zhang, S. Yokoyama, M. Hashii, D. Jin, M. Noda and J. Robbins (2005). "Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels." Neurosci Res **51**(3): 231-4.
- Hijiya, N., M. Setoguchi, K. Matsuura, Y. Higuchi, S. Akizuki and S. Yamamoto (1994). "Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter." Biochem J **303** (Pt 1): 255-62.
- Hongpaisan, J. and D. L. Alkon (2007). "A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19571-6.

- Houslay, M. D., M. Bushfield and G. Milligan (1990). "Phosphorylation of Gi in intact cells." Trends Biochem Sci **15**(1): 13.
- Hoyer, J. R., J. R. Asplin and L. Otvos (2001). "Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting the growth of calcium oxalate crystals." Kidney Int **60**(1): 77-82.
- Hu, D. D., J. R. Hoyer and J. W. Smith (1995). "Characterization of the interaction between integrins and recombinant human osteopontin." Ann N Y Acad Sci **760**: 312-4.
- Humphries, M. J. (2000). "Integrin structure." Biochem Soc Trans **28**(4): 311-39.
- Hunter, G. K., C. L. Kyle and H. A. Goldberg (1994). "Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation." Biochem J **300** (Pt 3): 723-8.
- Ichikawa, H., T. Itota, Y. Nishitani, Y. Torii, K. Inoue and T. Sugimoto (2000). "Osteopontin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat spinal and trigeminal nervous systems." Brain Res **863**(1-2): 276-81.
- Ihara, H., D. T. Denhardt, K. Furuya, T. Yamashita, Y. Muguruma, K. Tsuji, K. A. Hruska, K. Higashio, S. Enomoto, A. Nifuji, S. R. Rittling and M. Noda (2001). "Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin." J Biol Chem **276**(16): 13065-71.
- Iseman, M. D., D. L. Buschman and L. M. Ackerson (1991). "Pectus excavatum and scoliosis. Thoracic anomalies associated with pulmonary disease caused by Mycobacterium avium complex." Am Rev Respir Dis **144**(4): 914-6.

- Ishijima, M., K. Tsuji, S. R. Rittling, T. Yamashita, H. Kurosawa, D. T. Denhardt, A. Nifuji and M. Noda (2002). "Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice." J Bone Miner Res **17**(4): 661-7.
- Isoda, K., K. Nishikawa, Y. Kamezawa, M. Yoshida, M. Kusuhara, M. Moroi, N. Tada and F. Ohsuzu (2002). "Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation." Circ Res **91**(1): 77-82.
- Ito, T., Y. Hashimoto, E. Tanaka, T. Kan, S. Tsunoda, F. Sato, M. Higashiyama, T. Okumura and Y. Shimada (2006). "An inducible short-hairpin RNA vector against osteopontin reduces metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **12**(4): 1308-16.
- Ivanova, E. A., D. A. Bechtold, S. M. Dupre, J. Brennand, P. Barrett, S. M. Luckman and A. S. Loudon (2008). "Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(1): E176-82.
- Jackson, D. G., J. I. Bell, R. Dickinson, J. Timans, J. Shields and N. Whittle (1995). "Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon." J Cell Biol **128**(4): 673-85.
- Jiang, X. H., S. P. Tu, J. T. Cui, M. C. Lin, H. H. Xia, W. M. Wong, A. O. Chan, M. F. Yuen, S. H. Jiang, S. K. Lam, H. F. Kung, J. W. Soh, I. B. Weinstein and B. C. Wong (2004). "Antisense targeting protein kinase C alpha and beta1 inhibits gastric carcinogenesis." Cancer Res **64**(16): 5787-94.

- Jono, S., C. Peinado and C. M. Giachelli (2000). "Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification." J Biol Chem **275**(26): 20197-203.
- Joseloff, E., C. Cataisson, H. Aamodt, H. Ocheni, P. Blumberg, A. J. Kraker and S. H. Yuspa (2002). "Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes." J Biol Chem **277**(14): 12318-23.
- Kaartinen, M. T., A. Pirhonen, A. Linnala-Kankkunen and P. H. Maenpaa (1999). "Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties." J Biol Chem **274**(3): 1729-35.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh and M. Seiki (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.
- Kalomiris, E. L. and L. Y. Bourguignon (1988). "Mouse T lymphoma cells contain a transmembrane glycoprotein (GP85) that binds ankyrin." J Cell Biol **106**(2): 319-27.
- Kalomiris, E. L. and L. Y. Bourguignon (1989). "Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, GP85, and may function in GP85-ankyrin binding." J Biol Chem **264**(14): 8113-9.
- Karpuj, M. V., M. W. Becher, J. E. Springer, D. Chabas, S. Youssef, R. Pedotti, D. Mitchell and L. Steinman (2002). "Prolonged survival and decreased abnormal

movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine." Nat Med **8**(2): 143-9.

Kasugai, S., Q. Zhang, C. M. Overall, J. L. Wrana, W. T. Butler and J. Sodek (1991).

"Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter." Bone Miner **13**(3): 235-50.

Katagiri, Y. U., J. Sleeman, H. Fujii, P. Herrlich, H. Hotta, K. Tanaka, S. Chikuma, H.

Yagita, K. Okumura, M. Murakami, I. Saiki, A. F. Chambers and T. Uede (1999).

"CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis." Cancer Res **59**(1): 219-26.

Katayama, Y., C. M. House, N. Udagawa, J. J. Kazama, R. J. McFarland, T. J. Martin and

D. M. Findlay (1998). "Casein kinase 2 phosphorylation of recombinant rat osteopontin enhances adhesion of osteoclasts but not osteoblasts." J Cell Physiol **176**(1): 179-87.

Katoh, S., J. B. McCarthy and P. W. Kincade (1994). "Characterization of soluble CD44 in

the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth." J Immunol **153**(8): 3440-9.

Kerr, J. M., L. W. Fisher, J. D. Termine and M. F. Young (1991). "The cDNA cloning and

RNA distribution of bovine osteopontin." Gene **108**(2): 237-43.

- Kheifets, V. and D. Mochly-Rosen (2007). "Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function." Pharmacol Res **55**(6): 467-76.
- Kiefer, M. C., D. M. Bauer and P. J. Barr (1989). "The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin." Nucleic Acids Res **17**(8): 3306.
- Kim, S. Y., Y. S. Choi, J. S. Choi, J. H. Cha, O. N. Kim, S. B. Lee, J. W. Chung, M. H. Chun and M. Y. Lee (2002). "Osteopontin in kainic acid-induced microglial reactions in the rat brain." Mol Cells **13**(3): 429-35.
- Kleinman, J. G., J. A. Wesson and J. Hughes (2004). "Osteopontin and calcium stone formation." Nephron Physiol **98**(2): p43-7.
- Koguchi, Y., K. Kawakami, K. Uezu, K. Fukushima, S. Kon, M. Maeda, A. Nakamoto, I. Owan, M. Kuba, N. Kudeken, M. Azuma, S. Yara, T. Shinzato, F. Higa, M. Tateyama, J. Kadota, H. Mukae, S. Kohno, T. Uede and A. Saito (2003). "High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1355-9.
- Koivunen, J., V. Aaltonen and J. Peltonen (2006). "Protein kinase C (PKC) family in cancer progression." Cancer Lett **235**(1): 1-10.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 289-319.

- Lampasso, J. D., N. Marzec, J. Margarone, 3rd and R. Dziak (2002). "Role of protein kinase C alpha in primary human osteoblast proliferation." J Bone Miner Res **17**(11): 1968-76.
- Laurent, T. C. and J. R. Fraser (1992). "Hyaluronan." FASEB J **6**(7): 2397-404.
- Lee, M. Y., J. S. Choi, S. W. Lim, J. H. Cha, M. H. Chun and J. W. Chung (2001). "Expression of osteopontin mRNA in developing rat brainstem and cerebellum." Cell Tissue Res **306**(2): 179-85.
- Lefkowitz, R. J., J. Pitcher, K. Krueger and Y. Daaka (1998). "Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization." Adv Pharmacol **42**: 416-20.
- Leoni, E., P. Legnani, M. T. Mucci and R. Pirani (1999). "Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment." J Appl Microbiol **87**(5): 683-8.
- Lesley, J., Q. He, K. Miyake, A. Hamann, R. Hyman and P. W. Kincade (1992). "Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody." J Exp Med **175**(1): 257-66.
- Lester, L. B. and J. D. Scott (1997). "Anchoring and scaffold proteins for kinases and phosphatases." Recent Prog Horm Res **52**: 409-29; discussion 429-30.
- Letellier, K., B. Azeddine, S. Parent, H. Labelle, P. H. Rompre, A. Moreau and F. Moldovan (2008). "Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients." J Pineal Res **45**(4): 383-93.

- Levoye, A., J. Dam, M. A. Ayoub, J. L. Guillaume, C. Couturier, P. Delagrangé and R. Jockers (2006). "The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization." EMBO J **25**(13): 3012-23.
- Liaw, L., D. E. Birk, C. B. Ballas, J. S. Whitsitt, J. M. Davidson and B. L. Hogan (1998). "Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1)." J Clin Invest **101**(7): 1468-78.
- Liaw, L., V. Lindner, S. M. Schwartz, A. F. Chambers and C. M. Giachelli (1995). "Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro." Circ Res **77**(4): 665-72.
- Liaw, L., M. P. Skinner, E. W. Raines, R. Ross, D. A. Cheresh, S. M. Schwartz and C. M. Giachelli (1995). "The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro." J Clin Invest **95**(2): 713-24.
- Liu, D. and M. S. Sy (1996). "A cysteine residue located in the transmembrane domain of CD44 is important in binding of CD44 to hyaluronic acid." J Exp Med **183**(5): 1987-94.
- Lounsbury, K. M., B. Schlegel, M. Poncz, L. F. Brass and D. R. Manning (1993). "Analysis of Gz alpha by site-directed mutagenesis. Sites and specificity of protein kinase C-dependent phosphorylation." J Biol Chem **268**(5): 3494-8.
- Machida, M. (1999). "Cause of idiopathic scoliosis." Spine **24**(24): 2576-83.

- Machida, M., J. Dubousset, T. Satoh, I. Murai, K. B. Wood, T. Yamada and J. Ryu (2001).
 "Pathologic mechanism of experimental scoliosis in pinealectomized chickens."
Spine (Phila Pa 1976) **26**(17): E385-91.
- Mackay, C. R., H. J. Terpe, R. Stauder, W. L. Marston, H. Stark and U. Gunthert (1994).
 "Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans." J Cell Biol
124(1-2): 71-82.
- Mackay, H. J. and C. J. Twelves (2007). "Targeting the protein kinase C family: are we
 there yet?" Nat Rev Cancer **7**(7): 554-62.
- Malbon, C. C. and V. Karoor (1998). "G-protein-linked receptors as tyrosine kinase
 substrates: new paradigms in signal integration." Cell Signal **10**(8): 523-7.
- Malbon, C. C., J. Tao and H. Y. Wang (2004). "AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and
 molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes."
Biochem J **379**(Pt 1): 1-9.
- Marcus, R. (1996). "Biochemical assessment of bone resorption and formation." Bone **18**(1
 Suppl): 15S-16S.
- Martin, V., G. Garcia-Santos, J. Rodriguez-Blanco, S. Casado-Zapico, A. Sanchez-
 Sanchez, I. Antolin, M. Medina and C. Rodriguez (2009). "Melatonin sensitizes
 human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death." Cancer Lett.
- Martin, V., F. Herrera, G. Garcia-Santos, I. Antolin, J. Rodriguez-Blanco, M. Medina and
 C. Rodriguez (2007). "Involvement of protein kinase C in melatonin's oncostatic
 effect in C6 glioma cells." J Pineal Res **43**(3): 239-44.

- Mauroy, J.-C. d. (1996). La scoliose : traitement orthopédique conservateur. Montpellier (France), Sauramps médical.
- Maxwell, M. J., Y. Yuan, K. E. Anderson, M. L. Hibbs, H. H. Salem and S. P. Jackson (2004). "SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets." J Biol Chem **279**(31): 32196-204.
- McCahill, A., J. Warwicker, G. B. Bolger, M. D. Houslay and S. J. Yarwood (2002). "The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms." Mol Pharmacol **62**(6): 1261-73.
- McKee, M. D. and A. Nanci (1995). "Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein." Ann N Y Acad Sci **760**: 177-89.
- McMaster, M. E., A. J. Lee and R. G. Burwell (2006). "Indoor heated swimming pools: the vulnerability of some infants to develop spinal asymmetries years later." Stud Health Technol Inform **123**: 151-5.
- Mellor, H. and P. J. Parker (1998). "The extended protein kinase C superfamily." Biochem J **332 (Pt 2)**: 281-92.
- Milligan, G., M. Canals, J. D. Padiani, J. Ellis and J. F. Lopez-Gimenez (2006). "The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling." Ernst Schering Found Symp Proc(2): 145-61.

- Missaoui, B., P. Portero, S. Bendaya, O. Hanktie and P. Thoumie (2008). "Posture and equilibrium in orthopedic and rheumatologic diseases." Neurophysiol Clin **38**(6): 447-57.
- Miyauchi, A., J. Alvarez, E. M. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, D. Cheresch and et al. (1991). "Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts." J Biol Chem **266**(30): 20369-74.
- Molica, S., G. Vitelli, D. Levato, D. Giannarelli and G. M. Gandolfo (2001). "Elevated serum levels of soluble CD44 can identify a subgroup of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia who are at high risk of disease progression." Cancer **92**(4): 713-9.
- Moore, M. A., Y. Gotoh, K. Rafidi and L. C. Gerstenfeld (1991). "Characterization of a cDNA for chicken osteopontin: expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution." Biochemistry **30**(9): 2501-8.
- Moreau, A., D. S. Wang, S. Forget, B. Azeddine, D. Angeloni, F. Fraschini, H. Labelle, B. Poitras, C. H. Rivard and G. Grimard (2004). "Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis." Spine **29**(16): 1772-81.
- Morimoto, I., Y. Sasaki, S. Ishida, K. Imai and T. Tokino (2002). "Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53." Genes Chromosomes Cancer **33**(3): 270-8.

- Morinobu, M., M. Ishijima, S. R. Rittling, K. Tsuji, H. Yamamoto, A. Nifuji, D. T. Denhardt and M. Noda (2003). "Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo." J Bone Miner Res **18**(9): 1706-15.
- Mourton, T., C. B. Hellberg, S. M. Burden-Gulley, J. Hinman, A. Rhee and S. M. Brady-Kalnay (2001). "The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts." J Biol Chem **276**(18): 14896-901.
- Murthy, K. S., J. R. Grider and G. M. Makhlouf (2000). "Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of G(i-1) and G(i-2)." Am J Physiol Cell Physiol **279**(4): C925-34.
- Nakade, O., H. Koyama, H. Arijima, A. Yajima and T. Kaku (1999). "Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro." J Pineal Res **27**(2): 106-10.
- Naor, D. and S. Nedvetzki (2003). "CD44 in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **5**(3): 105-15.
- Naor, D., R. V. Sionov and D. Ish-Shalom (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." Adv Cancer Res **71**: 241-319.
- NCBI. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Neame, S. J. and C. M. Isacke (1992). "Phosphorylation of CD44 in vivo requires both Ser323 and Ser325, but does not regulate membrane localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells." EMBO J **11**(13): 4733-8.

- Neame, S. J., C. R. Uff, H. Sheikh, S. C. Wheatley and C. M. Isacke (1995). "CD44 exhibits a cell type dependent interaction with triton X-100 insoluble, lipid rich, plasma membrane domains." J Cell Sci **108 (Pt 9)**: 3127-35.
- Nelson, T. J. and D. L. Alkon (2009). "Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase C activators." Trends Biochem Sci **34(3)**: 136-45.
- Nielsen, J. N., C. Frosig, M. P. Sajan, A. Miura, M. L. Standaert, D. A. Graham, J. F. Wojtaszewski, R. V. Farese and E. A. Richter (2003). "Increased atypical PKC activity in endurance-trained human skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **312(4)**: 1147-53.
- Nishizuka, Y. and U. Kikkawa (2003). "Early studies of protein kinase C: a historical perspective." Methods Mol Biol **233**: 9-18.
- O'Neill, H. C. (1989). "Antibody which defines a subset of bone marrow cells that can migrate to thymus." Immunology **68(1)**: 59-65.
- O'Regan, A. and J. S. Berman (2000). "Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation." Int J Exp Pathol **81(6)**: 373-90.
- O'Regan, A. W., J. M. Hayden and J. S. Berman (2000). "Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells." J Leukoc Biol **68(4)**: 495-502.
- Okamoto, I., Y. Kawano, H. Tsuiki, J. Sasaki, M. Nakao, M. Matsumoto, M. Suga, M. Ando, M. Nakajima and H. Saya (1999). "CD44 cleavage induced by a membrane-

associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration." Oncogene **18**(7): 1435-46.

Oldberg, A., A. Franzen and D. Heinegard (1986). "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8819-23.

Oliveria, S. F., L. L. Gomez and M. L. Dell'Acqua (2003). "Imaging kinase--AKAP79--phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy." J Cell Biol **160**(1): 101-12.

Oyama, J., I. Murai, K. Kanazawa and M. Machida (2006). "Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels." J Pineal Res **40**(3): 219-24.

Palcy, S. and D. Goltzman (1999). "Protein kinase signalling pathways involved in the up-regulation of the rat alpha1(I) collagen gene by transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2 in osteoblastic cells." Biochem J **343 Pt 1**: 21-7.

Pandi-Perumal, S. R., I. Trakht, V. Srinivasan, D. W. Spence, G. J. Maestroni, N. Zisapel and D. P. Cardinali (2008). "Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways." Prog Neurobiol **85**(3): 335-53.

Papp, H., G. Czifra, E. Bodo, J. Lazar, I. Kovacs, M. Aleksza, I. Juhasz, P. Acs, S. Sipka, L. Kovacs, P. M. Blumberg and T. Biro (2004). "Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes." Cell Mol Life Sci **61**(9): 1095-105.

- Patarca, R., G. J. Freeman, R. P. Singh, F. Y. Wei, T. Durfee, F. Blattner, D. C. Regnier, C. A. Kozak, B. A. Mock, H. C. Morse, 3rd and et al. (1989). "Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection." J Exp Med **170**(1): 145-61.
- Pautke, C., M. Schieker, T. Tischer, A. Kolk, P. Neth, W. Mutschler and S. Milz (2004). "Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts." Anticancer Res **24**(6): 3743-8.
- Pedraza, C. E., L. G. Nikolcheva, M. T. Kaartinen, J. E. Barralet and M. D. McKee (2008). "Osteopontin functions as an opsonin and facilitates phagocytosis by macrophages of hydroxyapatite-coated microspheres: implications for bone wound healing." Bone **43**(4): 708-16.
- Perletti, G., E. Marras, D. Dondi, D. Osti, T. Congiu, R. Ferrarese, M. de Eguileor and A. H. Tashjian, Jr. (2005). "p21(Waf1/Cip1) and p53 are downstream effectors of protein kinase C delta in tumor suppression and differentiation in human colon cancer cells." Int J Cancer **113**(1): 42-53.
- Peters, M. F., K. S. Knappenberger, D. Wilkins, L. A. Sygowski, L. A. Lazor, J. Liu and C. W. Scott (2007). "Evaluation of cellular dielectric spectroscopy, a whole-cell, label-free technology for drug discovery on Gi-coupled GPCRs." J Biomol Screen **12**(3): 312-9.

- Peterson, R. M., Q. Yu, I. Stamenkovic and B. P. Toole (2000). "Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites." Am J Pathol **156**(6): 2159-67.
- Ponta, H., L. Sherman and P. A. Herrlich (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 33-45.
- Prince, C. W. (1989). "Secondary structure predictions for rat osteopontin." Connect Tissue Res **21**(1-4): 15-20.
- Prince, C. W. and W. T. Butler (1987). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells." Coll Relat Res **7**(4): 305-13.
- Prince, C. W., D. Dickie and C. L. Krumdieck (1991). "Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity." Biochem Biophys Res Commun **177**(3): 1205-10.
- Prince, C. W., T. Oosawa, W. T. Butler, M. Tomana, A. S. Bhowan, M. Bhowan and R. E. Schrohenloher (1987). "Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone." J Biol Chem **262**(6): 2900-7.
- Prinster, S. C., C. Hague and R. A. Hall (2005). "Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance." Pharmacol Rev **57**(3): 289-98.
- Protin, U., T. Schweighoffer, W. Jochum and F. Hilberg (1999). "CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets." J Immunol **163**(9): 4917-23.

- Pure, E. and C. A. Cuff (2001). "A crucial role for CD44 in inflammation." Trends Mol Med **7**(5): 213-21.
- Qiu, J., M. A. Bosch, S. C. Tobias, D. K. Grandy, T. S. Scanlan, O. K. Ronnekleiv and M. J. Kelly (2003). "Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C." J Neurosci **23**(29): 9529-40.
- Rackowski, J. W. (2007). "The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis." Neuro Endocrinol Lett **28**(3): 302-4.
- Ramirez-Rodriguez, G., L. Ortiz-Lopez and G. Benitez-King (2007). "Melatonin increases stress fibers and focal adhesions in MDCK cells: participation of Rho-associated kinase and protein kinase C." J Pineal Res **42**(2): 180-90.
- Reiter, R. J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." Endocr Rev **12**(2): 151-80.
- Ries, A., J. L. Goldberg and B. Grimpe (2007). "A novel biological function for CD44 in axon growth of retinal ganglion cells identified by a bioinformatics approach." J Neurochem **103**(4): 1491-505.
- Rittling, S. R., Y. Chen, F. Feng and Y. Wu (2002). "Tumor-derived osteopontin is soluble, not matrix associated." J Biol Chem **277**(11): 9175-82.
- Rittling, S. R. and D. T. Denhardt (1999). "Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice." Exp Nephrol **7**(2): 103-13.

- Rittling, S. R., H. N. Matsumoto, M. D. McKee, A. Nanci, X. R. An, K. E. Novick, A. J. Kowalski, M. Noda and D. T. Denhardt (1998). "Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro." J Bone Miner Res **13**(7): 1101-11.
- Rivard, C. H., P. Labelle, R. Simoneau, M. Duhaime, B. Poitras and P. Simard (1982). "[Moderate hypobaric hypoxia used as an inducer of congenital vertebral malformation in mouse embryo (author's transl)]." Chir Pediatr **23**(1): 65-7.
- Ron, D. and D. Mochly-Rosen (1994). "Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins." J Biol Chem **269**(34): 21395-8.
- Rosdahl, J. A., T. L. Mourton and S. M. Brady-Kalnay (2002). "Protein kinase C delta (PKCdelta) is required for protein tyrosine phosphatase mu (PTPmu)-dependent neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci **19**(2): 292-306.
- Ross, A. W., C. A. Webster, M. Thompson, P. Barrett and P. J. Morgan (1998). "A novel interaction between inhibitory melatonin receptors and protein kinase C-dependent signal transduction in ovine pars tuberalis cells." Endocrinology **139**(4): 1723-30.
- Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum and D. A. Cheresch (1993). "Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption." J Biol Chem **268**(13): 9901-7.

- Roth, J. A., B. G. Kim, W. L. Lin and M. I. Cho (1999). "Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation." J Biol Chem **274**(31): 22041-7.
- Rousche, K. T. and C. B. Knudson (2002). "Temporal expression of CD44 during embryonic chick limb development and modulation of its expression with retinoic acid." Matrix Biol **21**(1): 53-62.
- Safran, J. B., W. T. Butler and M. C. Farach-Carson (1998). "Modulation of osteopontin post-translational state by 1, 25-(OH)₂-vitamin D₃. Dependence on Ca²⁺ influx." J Biol Chem **273**(45): 29935-41.
- Saitoh, Y., J. Kuratsu, H. Takeshima, S. Yamamoto and Y. Ushio (1995). "Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy." Lab Invest **72**(1): 55-63.
- Sakagami, M. (2000). "Role of osteopontin in the rodent inner ear as revealed by in situ hybridization." Med Electron Microsc **33**(1): 3-10.
- Salih, E., H. Y. Zhou and M. J. Glimcher (1996). "Phosphorylation of purified bovine bone sialoprotein and osteopontin by protein kinases." J Biol Chem **271**(28): 16897-905.
- Salter, D. M., J. E. Robb and M. O. Wright (1997). "Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction." J Bone Miner Res **12**(7): 1133-41.
- Santini, M. T., C. Cametti, P. L. Indovina and S. W. Peterson (1994). "Membrane electrical properties associated with insulin receptor downregulation in human erythrocytes." Exp Hematol **22**(1): 40-4.

- Sato, M., E. Morii, T. Komori, H. Kawahata, M. Sugimoto, K. Terai, H. Shimizu, T. Yasui, H. Ogihara, N. Yasui, T. Ochi, Y. Kitamura, Y. Ito and S. Nomura (1998). "Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2alphaA/CBFA1 and ETS1 in the skeletal tissues." Oncogene **17**(12): 1517-25.
- Scatena, M., M. Almeida, M. L. Chaisson, N. Fausto, R. F. Nicosia and C. M. Giachelli (1998). "NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival." J Cell Biol **141**(4): 1083-93.
- Schallmach, E., D. Steiner and Z. Vogel (2006). "Inhibition of AC-II activity following chronic agonist exposure is modulated by phosphorylation." J Mol Neurosci **29**(2): 115-22.
- Schechtman, D. and D. Mochly-Rosen (2001). "Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction." Oncogene **20**(44): 6339-47.
- Schlosser, W., F. Gansauge, S. Schlosser, S. Gansauge and H. G. Beger (2001). "Low serum levels of CD44, CD44v6, and neopterin indicate immune dysfunction in chronic pancreatitis." Pancreas **23**(4): 335-40.
- Schmits, R., J. Filmus, N. Gerwin, G. Senaldi, F. Kiefer, T. Kundig, A. Wakeham, A. Shahinian, C. Catzavelos, J. Rak, C. Furlonger, A. Zakarian, J. J. Simard, P. S. Ohashi, C. J. Paige, J. C. Gutierrez-Ramos and T. W. Mak (1997). "CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity." Blood **90**(6): 2217-33.

- Screaton, G. R., M. V. Bell, D. G. Jackson, F. B. Cornelis, U. Gerth and J. I. Bell (1992). "Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12160-4.
- Senger, D. R., S. R. Ledbetter, K. P. Claffey, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Peruzzi and M. Detmar (1996). "Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin." Am J Pathol **149**(1): 293-305.
- Senger, D. R., D. F. Wirth and R. O. Hynes (1979). "Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins." Cell **16**(4): 885-93.
- Seok, S. H., H. C. Koo, A. Kasuga, Y. Kim, E. G. Lee, H. Lee, J. H. Park, M. W. Baek, H. Y. Lee, D. J. Kim, B. H. Lee, Y. S. Lee and S. N. Cho (2006). "Use of PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of zoonotic mycobacteriosis in zebrafish caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*." Vet Microbiol **114**(3-4): 292-7.
- Shanmugam, M., N. L. Krett, C. A. Peters, E. T. Maizels, F. M. Murad, H. Kawakatsu, S. T. Rosen and M. Hunzicker-Dunn (1998). "Association of PKC delta and active Src in PMA-treated MCF-7 human breast cancer cells." Oncogene **16**(13): 1649-54.
- Shevde, L. A., R. S. Samant, J. C. Paik, B. J. Metge, A. F. Chambers, G. Casey, A. R. Frost and D. R. Welch (2006). "Osteopontin knockdown suppresses tumorigenicity of

- human metastatic breast carcinoma, MDA-MB-435." Clin Exp Metastasis **23**(2): 123-33.
- Shi, M., K. Dennis, J. J. Peschon, R. Chandrasekaran and K. Mikecz (2001). "Antibody-induced shedding of CD44 from adherent cells is linked to the assembly of the cytoskeleton." J Immunol **167**(1): 123-31.
- Shiraga, H., W. Min, W. J. VanDusen, M. D. Clayman, D. Miner, C. H. Terrell, J. R. Sherbotie, J. W. Foreman, C. Przysiecki, E. G. Neilson and et al. (1992). "Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 426-30.
- Shohat, M., T. Shohat, M. Nitzan, M. Mimouni, R. Kedem and Y. L. Danon (1988). "Growth and ethnicity in scoliosis." Acta Orthop Scand **59**(3): 310-3.
- Skogland, L. B. and J. A. Miller (1980). "Growth related hormones in idiopathic scoliosis. An endocrine basis for accelerated growth." Acta Orthop Scand **51**(5): 779-80.
- Smith, L. L., H. K. Cheung, L. E. Ling, J. Chen, D. Sheppard, R. Pytela and C. M. Giachelli (1996). "Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin." J Biol Chem **271**(45): 28485-91.
- Sodek, J., J. Chen, T. Nagata, S. Kasugai, R. Todescan, Jr., I. W. Li and R. H. Kim (1995). "Regulation of osteopontin expression in osteoblasts." Ann N Y Acad Sci **760**: 223-41.
- Sodek, J., B. Ganss and M. D. McKee (2000). "Osteopontin." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 279-303.

- Sodhi, C. P., S. A. Phadke, D. Batlle and A. Sahai (2001). "Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose." Diabetes **50**(6): 1482-90.
- Sonnenburg, E. D., T. Gao and A. C. Newton (2001). "The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **276**(48): 45289-97.
- Sorensen, E. S., P. Hojrup and T. E. Petersen (1995). "Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites." Protein Sci **4**(10): 2040-9.
- Sorensen, E. S. and T. E. Petersen (1995). "Phosphorylation, glycosylation, and transglutaminase sites in bovine osteopontin." Ann N Y Acad Sci **760**: 363-6.
- Sorensen, E. S., L. K. Rasmussen, L. Moller, P. H. Jensen, P. Hojrup and T. E. Petersen (1994). "Localization of transglutaminase-reactive glutamine residues in bovine osteopontin." Biochem J **304** (Pt 1): 13-6.
- Spurney, R. F., P. J. Flannery, S. C. Garner, K. Athirakul, S. Liu, F. Guilak and L. D. Quarles (2002). "Anabolic effects of a G protein-coupled receptor kinase inhibitor expressed in osteoblasts." J Clin Invest **109**(10): 1361-71.
- Stamenkovic, I., M. Amiot, J. M. Pesando and B. Seed (1989). "A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family." Cell **56**(6): 1057-62.

- Steinberg, S. F. (2004). "Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta." Biochem J **384**(Pt 3): 449-59.
- Steinem, C., A. Janshoff, J. Wegener, W. P. Ulrich, W. Willenbrink, M. Sieber and H. J. Galla (1997). "Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers." Biosens Bioelectron **12**(8): 787-808.
- Strassheim, D. and C. C. Malbon (1994). "Phosphorylation of Gi alpha 2 attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells." J Biol Chem **269**(19): 14307-13.
- Tabakoff, B., E. Nelson, M. Yoshimura, K. Hellevuo and P. L. Hoffman (2001). "Phosphorylation cascades control the actions of ethanol on cell cAMP signalling." J Biomed Sci **8**(1): 44-51.
- Takahashi, F., S. Akutagawa, H. Fukumoto, S. Tsukiyama, Y. Ohe, K. Takahashi, Y. Fukuchi, N. Saijo and K. Nishio (2002). "Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice." Int J Cancer **98**(5): 707-12.
- Takahashi, F., K. Takahashi, K. Maeda, S. Tominaga and Y. Fukuchi (2000). "Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells." IUBMB Life **49**(3): 217-21.
- Tezuka, K., T. Sato, H. Kamioka, P. J. Nijweide, K. Tanaka, T. Matsuo, M. Ohta, N. Kurihara, Y. Hakeda and M. Kumegawa (1992). "Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 911-7.

- Thillard, M. J. (1959). "[Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick.]." C R Hebd Seances Acad Sci **248**(8): 1238-40.
- Trueblood, N. A., Z. Xie, C. Communal, F. Sam, S. Ngoy, L. Liaw, A. W. Jenkins, J. Wang, D. B. Sawyer, O. H. Bing, C. S. Apstein, W. S. Colucci and K. Singh (2001). "Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin." Circ Res **88**(10): 1080-7.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara and A. Kawai (1994). "ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons." J Cell Biol **126**(2): 391-401.
- Underhill, C. B., G. Chi-Rosso and B. P. Toole (1983). "Effects of detergent solubilization on the hyaluronate-binding protein from membranes of simian virus 40-transformed 3T3 cells." J Biol Chem **258**(13): 8086-91.
- Vanecek, J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." Physiol Rev **78**(3): 687-721.
- Vanecek, J., A. Pavlik and H. Illnerova (1987). "Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography." Brain Res **435**(1-2): 359-62.
- Vanecek, J. and L. Vollrath (1989). "Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary." Brain Res **505**(1): 157-9.
- Verdonk, E., K. Johnson, R. McGuinness, G. Leung, Y. W. Chen, H. R. Tang, J. M. Michelotti and V. F. Liu (2006). "Cellular dielectric spectroscopy: a label-free

- comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors." Assay Drug Dev Technol **4**(5): 609-19.
- Vinos, J., K. Jalink, R. W. Hardy, S. G. Britt and C. S. Zuker (1997). "A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function." Science **277**(5326): 687-90.
- von Gall, C., A. Lewy, C. Schomerus, B. Vivien-Roels, P. Pevet, H. W. Korf and J. H. Stehle (2000). "Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice." Eur J Neurosci **12**(3): 964-72.
- Wai, P. Y. and P. C. Kuo (2008). "Osteopontin: regulation in tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **27**(1): 103-18.
- Wai, P. Y., Z. Mi, H. Guo, S. Sarraf-Yazdi, C. Gao, J. Wei, C. E. Marroquin, B. Clary and P. C. Kuo (2005). "Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis." Carcinogenesis **26**(4): 741-51.
- Wang, L., X. Guan, R. Tang, J. R. Hoyer, A. Wierzbicki, J. J. De Yoreo and G. H. Nancollas (2008). "Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of calcium oxalate crystallization." J Phys Chem B **112**(30): 9151-7.
- Weber, G. F., S. Ashkar, M. J. Glimcher and H. Cantor (1996). "Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)." Science **271**(5248): 509-12.

- Weber, G. F., S. Zawaideh, S. Hikita, V. A. Kumar, H. Cantor and S. Ashkar (2002). "Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation." J Leukoc Biol **72**(4): 752-61.
- Wegener, J., S. Zink, P. Rosen and H. Galla (1999). "Use of electrochemical impedance measurements to monitor beta-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells." Pflugers Arch **437**(6): 925-34.
- Witt-Enderby, P. A., J. Bennett, M. J. Jarzynka, S. Firestine and M. A. Melan (2003). "Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms." Life Sci **72**(20): 2183-98.
- Wittig, B. M., B. Johansson, M. Zoller, C. Schwarzler and U. Gunthert (2000). "Abrogation of experimental colitis correlates with increased apoptosis in mice deficient for CD44 variant exon 7 (CD44v7)." J Exp Med **191**(12): 2053-64.
- Woodruff, J. J., L. M. Clarke and Y. H. Chin (1987). "Specific cell-adhesion mechanisms determining migration pathways of recirculating lymphocytes." Annu Rev Immunol **5**: 201-22.
- Wrana, J. L., Q. Zhang and J. Sodek (1989). "Full length cDNA sequence of porcine secreted phosphoprotein-I (SPP-I, osteopontin)." Nucleic Acids Res **17**(23): 10119.
- Wynne-Davies, R. (1968). "Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey." J Bone Joint Surg Br **50**(1): 24-30.

- Yamamoto, S., N. Hijiya, M. Setoguchi, K. Matsuura, T. Ishida, Y. Higuchi and S. Akizuki (1995). "Structure of the osteopontin gene and its promoter." Ann N Y Acad Sci **760**: 44-58.
- Yasui, T., K. Fujita, K. Asai and K. Kohri (2002). "Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells." Int J Urol **9**(2): 100-8.
- Yoshitake, H., S. R. Rittling, D. T. Denhardt and M. Noda (1999). "Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8156-60.
- You, J., C. E. Yellowley, H. J. Donahue, Y. Zhang, Q. Chen and C. R. Jacobs (2000). "Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow." J Biomech Eng **122**(4): 387-93.
- Young, M. F., J. M. Kerr, J. D. Termine, U. M. Wewer, M. G. Wang, O. W. McBride and L. W. Fisher (1990). "cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)." Genomics **7**(4): 491-502.
- Yu, Q. and B. P. Toole (1996). "A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44." J Biol Chem **271**(34): 20603-7.
- Yu, W. H., J. F. Woessner, Jr., J. D. McNeish and I. Stamenkovic (2002). "CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor

precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling." Genes Dev **16**(3): 307-23.

- Yu, X. Q., J. M. Fan, D. J. Nikolic-Paterson, N. Yang, W. Mu, R. Pichler, R. J. Johnson, R. C. Atkins and H. Y. Lan (1999). "IL-1 up-regulates osteopontin expression in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat." Am J Pathol **154**(3): 833-41.
- Zhao, X., S. M. Jones, W. B. Thoreson and Y. W. Lundberg (2008). "Osteopontin is not critical for otoconia formation or balance function." J Assoc Res Otolaryngol **9**(2): 191-201.
- Zhou, D. F., J. F. Ding, L. J. Picker, R. F. Bargatze, E. C. Butcher and D. V. Goeddel (1989). "Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor." J Immunol **143**(10): 3390-5.
- Zhu, Y., D. T. Denhardt, H. Cao, P. D. Sutphin, A. C. Koong, A. J. Giaccia and Q. T. Le (2005). "Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer." Oncogene **24**(43): 6555-63.
- Zirngibl, R. A., J. S. Chan and J. E. Aubin (2008). "Estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) regulates osteopontin expression through a non-canonical ERRalpha response element in a cell context-dependent manner." J Mol Endocrinol **40**(2): 61-73.